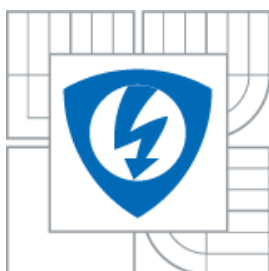




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ANALÝZA ELEKTRICKÝCH BIOLOGICKÝCH SIGNÁLŮ V EXPERIMENTÁLNÍ KARDIOLOGII

ANALYSIS OF BIOSIGNALS IN CARDIOVASCULAR RESEARCH

DOKTORSKÁ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. OTO JANOUŠEK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. JANA KOLÁŘOVÁ, Ph.D.

BRNO 2013

ABSTRAKT

Disertační práce se zaměřuje na problematiku odstranění pohybového artefaktu z optických záznamů akčního napětí. V širších souvislostech se zabývá optickým snímáním elektrické aktivity izolovaného srdce a pokročilými metodami zpracování signálů. V práci je popsán inovativní přístup k odstranění pohybového artefaktu založený na využití metody nezávislých komponent. Součástí práce je ověření navrženého přístupu na simulovaných i reálných datech a srovnání přístupu s doposud publikovanými přístupy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pohybový artefakt, odstranění pohybového artefaktu, metoda nezávislých komponent, optická metoda.

ABSTRACT

The new approach for motion artifact suppression in optical action potential records is presented in this thesis. Presented approach is based on independent component analysis utilization. Efficiency of proposed approach is evaluated here as well as its comparison with state of the art motion artifact suppression approaches.

KEYWORDS

Motion artifact, motion artifact suppression, independent component analysis, optical method.

JANOUSEK, O. *Analýza elektrických biologických signálů v experimentální kardiologii*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Ústav biomedicínského inženýrství, 2013. 120 s. Disertační práce. Vedoucí práce: doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou disertační práci na téma Analýza elektrických biologických signálů v experimentální kardiologii jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucí disertační práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené disertační práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této disertační práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji všem, kteří mi umožnili sepsání dizertační práce a podíleli se na experimentech.

Děkuji školitelce doc. Janě Kolářové, Ph.D. za vedení v průběhu doktorského studia, za metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc při realizaci této práce a za čas a ochotu, kterou mi věnovala během experimentů. Děkuji prof. Marii Novákové, Ph.D. za odborné rady v oblasti elektrofyziologie srdce, a za vedení v průběhu doktorského studia. Děkuji Ing. Marině Ronzhině za odborné konzultace a za významnou pomoc při návrhu, provedení a analýze experimentů. Děkuji paní Branislavě Vyoralové za pomoc s realizací experimentů.

Děkuji prof. Ivo Provazníkovi, Ph.D. za odborné rady při sepisování této práce a publikacích výsledků, a pomoc se získáním finančních prostředků pro odbornou stáž. Nadaci Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových děkuji za projevenou důvěru a finanční podporu umožňující odbornou zahraniční stáž. Děkuji VUT v Brně za poskytnuté cestovní stipendium.

Experimentální část této dizertační práce byla podpořena v rámci projektu Evropského fondu pro regionální rozvoj FNUSA-ICRC CZ.1.05/1.1.00/02.0123.

V Brně dne

.....(podpis autora)

OBSAH

Seznam obrázků	ix
Seznam tabulek	xiii
1 Úvod	14
2 Záznam elektrické aktivity izolovaného srdce	15
2.1 Akční napětí	16
2.2 Elektrogram	18
3 Optická metoda	19
4 Pohybový artefakt	23
4.1 Vznik pohybového artefaktu	23
4.1.1 Proximálně-distální změna vzdálenosti srdeční stěny od fotodetektoru	23
4.1.2 Změna počtu molekul VSD v zorném poli fotodetektoru	24
4.1.3 Optické vlastnosti srdeční tkáně	25
4.1.4 Prostorová orientace molekul barviva	25
4.2 Matematický model pohybového artefaktu	25
5 Způsoby omezení pohybového artefaktu	27
5.1 Farmakologické blokátory pohybu	27
5.2 Mechanické omezení pohybu	29
5.3 Techniky zpracování signálu	29
6 Poměrová metoda	30
6.1 Princip poměrové metody	30
6.2 Výhody poměrové metody	34
6.3 Nevýhody poměrové metody	35
7 Metoda nezávislých komponent (ICA)	36
7.1 Terminologie ICA	36
7.2 Model ICA	37
7.3 Cíl ICA	38
7.4 Podmínky použití ICA	39
8 Varianty ICA	39
8.1 ICA pracující se signály jako s náhodnými veličinami	40
8.2 ICA využívající časovou strukturu signálu	42

8.2.1	Algoritmus AMUSE	43
8.2.2	Algoritmus SOBI	44
8.2.3	Algoritmus WASOBI	45
9	Cíle dizertační práce	48
10	Registrace elektrické aktivity srdce	49
10.1	Perfuze srdce a zajištění jeho vitálních funkcí	49
10.2	Záznam elektrogramu	50
10.3	Záznam akčního napětí	52
10.3.1	Zdroj excitačního světla	52
10.3.2	Snímání emisního světla	54
10.4	Charakteristika signálů zaznamenaných optickou metodou	55
11	Pohybový artefakt v záznamech akčního napětí	58
11.1	Akční napětí ovlivněné pohybovým artefaktem	58
11.2	Časový vývoj pohybového artefaktu	59
11.3	Frekvenční obsah pohybového artefaktu	61
11.4	Variabilita pohybového artefaktu v záznamech akčního napětí	62
12	Potlačení pohybového artefaktu pomocí ICA	63
12.1	Model ICA pro optický záznam AN	63
12.2	Ověření platnosti podmínek modelu ICA pro optický záznam akčního napětí	66
12.2.1	Charakteristika akčního napětí z pohledu ICA	66
12.2.2	Charakteristika pohybového artefaktu z pohledu ICA	66
12.2.3	Ověření statistické nezávislosti akčního napětí a pohybového artefaktu	70
13	Teoretický výběr varianty ICA	72
13.1	Vlastnosti ICA pracující se signály jako s náhodnými veličinami	72
13.2	Vlastnosti ICA využívající časovou strukturu signálů	73
13.2.1	Vlastnosti algoritmu AMUSE	73
13.2.2	Vlastnosti algoritmu SOBI	73
13.2.3	Vlastnosti algoritmu WASOBI	75
14	Empirický výběr ICA varianty	77
14.1	Účelová funkce a optimalizační algoritmus ICA	77
14.2	Výsledky separace pro modelová data	77
15	Ověření korektnosti separace	82
15.1	První způsob ověření výsledků ICA: mnohonásobně opakovaná ICA	82

15.1.1	Monte Carlo analýza pro SIR definovaný pomocí zdrojového signálu a separované komponenty.	83
15.1.2	Monte Carlo analýza pro SIR definovaný pomocí mixážní a separační matice	84
15.1.3	Separace ve zvlášť nepříznivých podmínkách	89
15.2	Druhý způsob ověření výsledků ICA: srovnání ICA a poměrové metody	91
15.3	Vliv šumu na korektnost separace	96
16	Diskuze	99
16.1	Záznam optických signálů a elektrogramů	99
16.2	Charakteristika pohybového artefaktu	99
16.3	Odstranění pohybového artefaktu pomocí ICA	100
16.4	Ověření korektnosti separace	100
16.5	Srovnání ICA a alternativních přístupů k odstranění pohybového artefaktu	101
16.6	Limitace odstranění pohybového artefaktu pomocí ICA	102
16.6.1	Neznámý rozptyl signálů	102
16.6.2	Neznámé pořadí separovaných komponent	103
16.6.3	Limitace konstrukčního řešení záznamové aparatury	103
17	Závěr	104
18	Literatura	105
19	Seznam symbolů, veličin a zkratk	116
20	Seznam příloh	117

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 2.1: Průběh AN. Převzato a upraveno z [1].	16
Obrázek 2.2: Záznam elektrogramu jednoho srdečního cyklu s popisem charakteristických vln a komplexů.	18
Obrázek 3.1: Molekulární struktura napětově citlivého barviva di-4-ANEPPS. Převzato a upraveno z [29].	19
Obrázek 3.2: Excitační a emisní spektrum di-4-ANEPPS, převzato a upraveno z [47].	20
Obrázek 3.3: Změna celkové intenzity světla ve spektrálním pásmu vymezeném optickým filtrem při změně akčního napětí.	21
Obrázek 3.4: Kontrukční řešení snímacího systému využívajícího dichroické zrcadlo.	22
Obrázek 3.5: Kontrukční řešení snímacího systému využívajícího optická vlákna.	22
Obrázek 4.1: Proximálně-distální změna vzdálenosti stěny srdce od fotodetektoru.	24
Obrázek 4.2: Zvýšení počtu di-4-ANEPPS nabarvených buněk v rovině fotodetektoru během kontrakce izolovaného srdce.	24
Obrázek 5.1: Vliv blebbistatinu na tvar AN (levá část obrázku) a potlačení pohybového artefaktu blebbistatinem (pravá část obrázku), převzato z [48] a upraveno.	28
Obrázek 6.1: Princip poměrové metody. Ve směru shora dolů jsou zobrazena emisní spektra napětově citlivého barviva; sloupcové grafy vyjadřující obsah plochy pod křivkou emisního spektra; sloupcové grafy vyjadřující poměr ploch v zelené a červené oblasti spektra. V levé části obrázku je situace vykreslena pro excitaci barviva nižší intenzitou excitačního světla, v pravé části obrázku pro excitaci vyšší intenzitou.	31
Obrázek 6.2: Vlevo – vzájemně opačné průběhy akčního napětí v červené a zelené oblasti spektra, vpravo – podíl obou průběhů z levé části obrázku. Situace odpovídá záznamu akčního napětí bez pohybového artefaktu.	32
Obrázek 6.3: Vlevo – vzájemně opačné průběhy akčního napětí v červené a zelené oblasti spektra, vpravo – podíl obou průběhů z levé části obrázku. Situace odpovídá záznamu akčního napětí s pohybovým artefaktem.	32
Obrázek 6.4: Průběh reálně zaznamenaných optických signálů (vlevo) a výsledek poměrové metody (vpravo).	33
Obrázek 7.1: Proces smísení a opětovné separace záznamů hlasů dvou řečníků.	37
Obrázek 7.2: Obecný model ICA.	38

Obrázek 8.1: Vlevo - záznamy dvou komponent tvořených náhodnými signály s rovnoměrným rozložením pravděpodobnosti; uprostřed – odhady hustoty pravděpodobnosti pro tyto signály; vpravo - korelační diagramy smíšených a separovaných komponent.	41
Obrázek 8.2: Vlevo - záznamy dvou komponent tvořených náhodnými signály s Gaussovým rozložením pravděpodobnosti; uprostřed – odhady hustoty pravděpodobnosti pro tyto signály; vpravo - korelační diagramy smíšených a separovaných komponent.	42
Obrázek 10.1: Konstrukční řešení svodového systému pro záznam tří elektrogramů (EG).	50
Obrázek 10.2: Vlevo - vanička s izolovaným srdcem; vpravo - perfusní systém.	51
Obrázek 10.3: Ukázka tří zaznamenaných vzájemně ortogonálních elektrogramů.	51
Obrázek 10.4: Měřicí systém, převzato a upraveno z [37].	53
Obrázek 10.5: Průřez optickou sondou FCR-7IR200-2-ME.	53
Obrázek 10.6: Spektrální rozsah segmentů fotodiody a geometrické řešení segmentů.	54
Obrázek 10.7: Srovnání detekčních spekter diody S9032-02 s fluorescenčními spektry di-4-ANEPPS.	56
Obrázek 10.8: Záznam optických signálů v červené, zelené a modré oblasti spektra (horní tři záznamy) a simultánní záznam tří elektrogramů (dolní tři záznamy).	57
Obrázek 11.1: Časový průběh akčního napětí (plnou čarou) a akčního napětí s pohybovým artefaktem (přerušovanou čarou).	59
Obrázek 11.2: Časový vývoj (nepředzpracovaných) průběhů akčního napětí během opakovaných ischemií. Horní řada - opakované ischemie; dolní řada - k ischemiím příslušející reperfuze.	60
Obrázek 11.3: Velikost akčního napětí během opakovaných ischemií.	60
Obrázek 11.4: Časový a frekvenční průběh AN a AN s PA a jejich spektrogramy.	61
Obrázek 11.5: Záznamy repetitivního AN s PA pro čtyři izolovaná srdce.	62
Obrázek 12.1: Odhad počtu separovaných komponent z optických signálů	64
Obrázek 12.2: Vztah konstrukčního řešení záznamové aparatury a modelu ICA	64
Obrázek 12.3: Zaznamenané optické signály $R(t)$ a $G(t)$, doplněné elektrogramem.	65
Obrázek 12.4: Modelový průběh akčního napětí.	66
Obrázek 12.5: Ukázka variability tvaru pohybového artefaktu.	68
Obrázek 12.6: Deset vybraných záznamů pohybového artefaktu.	69
Obrázek 12.7: Vlevo - odhad sdružené pravděpodobnosti (sdr. pst.) AN a PA; vpravo - součin odhadu marginálních hustot (marg. hust.) pro AN a PA.	70
Obrázek 13.1: Záznam AN a PA, hustoty pravděpodobnosti pro AN a PA, a	

korelační diagramy smíšených a separovaných komponent.	72
Obrázek 14.1: Vznik modelových optických signálů: vlevo - průběhy AN a PA, vpravo - modelové optické signály vzniklé kombinací AN a PA z levé části obrázku.	78
Obrázek 14.2: Tvar správně odhadnutého průběhu akčního napětí.	79
Obrázek 14.3: Tvar nesprávně odhadnutého průběhu akčního napětí.	79
Obrázek 14.4: Tvar částečně správně odhadnutého průběhu akčního napětí.	79
Obrázek 14.5: Vlevo - původní komponenty, vlevo; vpravo - komponenty separované pomocí WASOBI.	81
Obrázek 15.1: Oblasti ověření korektní separace komponent.	82
Obrázek 15.2: Deset výsledků opakovaného běhu WASOBI pro stejná vstupní data. Každý výsledek je zobrazen odlišnou barvou.	83
Obrázek 15.3: Výsledek Monte Carlo analýzy pro první směs průběhů akčního napětí a pohybového artefaktu pro parametr SIR získaný ze separovaných zdrojů.	85
Obrázek 15.4: Výsledek Monte Carlo analýzy pro první směs průběhů akčního napětí a pohybového artefaktu pro parametr SIR získaný ze separační matice.	85
Obrázek 15.5: Diagonalita odhadnuté matice G.	88
Obrázek 15.6: Srovnání výsledků poměrové metody a metody ICA. Shora dolů: srovnání průběhů akčního napětí získaného pomocí poměrové metody (modře) a pomocí WASOBI (červeně); simultánní záznam elektrogramu; původní optický záznam v červené oblasti spektra; původní optický záznam v zelené oblasti spektra.	93
Obrázek 15.7: Srovnání výsledků poměrové metody a metody ICA. Shora dolů: srovnání průběhů akčního napětí získaného pomocí poměrové metody (modře) a pomocí WASOBI (červeně); simultánní záznam elektrogramu; původní optický záznam v červené oblasti spektra; původní optický záznam v zelené oblasti spektra.	94
Obrázek 15.8: Srovnání výsledků poměrové metody a ICA. Shora dolů: srovnání průběhů akčního napětí získaného pomocí poměrové metody (modře) a pomocí WASOBI (červeně); simultánní záznam elektrogramu; původní optický záznam v červené oblasti spektra; původní optický záznam v zelené oblasti spektra.	95
Obrázek 15.9: Schéma výroby umělých optických signálů a jejich opětovné oddělení.	96
Obrázek 15.10: Srovnání poměru signálu k šumu pro průběh AN získaný metodou WASOBI a poměrovou metodou.	97
Obrázek 15.11: Srovnání výsledků metody WASOBI a poměrové metody při různých úrovních šumu. Modrou barvou je zobrazen průběh akčního napětí získaného poměrovou metodou; červenou barvou je	

znázorněn průběh získaný metodou WASOBI; zelenou barvou je zobrazen správný průběh akčního napětí. Průběhy jsou vzájemně posunuty na vertikální ose, aby bylo usnadněno jejich vizuální srovnání.

98

SEZNAM TABULEK

Tabulka 12.1: Odhad vzájemné informace $I(\text{AN}, \text{PA}_i)$ pro deset kombinací AN a PA.	71
Tabulka 14.1: Výsledky separace uměle smíšeného signálu. Šedou barvou jsou zvýrazněny varianty ICA, které korektně separovaly komponenty ve všech deseti případech.	80
Tabulka 15.1: Hodnoty SIRS.	86
Tabulka 15.2: Hodnoty SIRA.	87
Tabulka 15.3: Index separace metody WASOBI pro deset kombinací AN a PA.	88
Tabulka 15.4: Střední hodnoty SIRS a jejich směrodatné odchylky.	89
Tabulka 15.5: Střední hodnoty SIRA a jejich směrodatné odchylky.	90
Tabulka 15.6: Index separability metody WASOBI pro deset kombinací AN a PA v případě špatně podmíněné mixážní matice.	90

1 ÚVOD

Srdce je dutý svalový orgán, zajišťující průtok krve oběhovým systémem. Svou pravidelnou kontrakcí vytváří tlakový gradient, potřebný k toku krve do tkání a orgánů. Tím srdce zajišťuje zásobování orgánů dýchacími plyny, živinami, a dalšími látkami, které jsou krví přenášeny [1]. Činnost srdce je koordinována elektricky, šířením akčního napětí (AN) myokardem.

Současné přístupy k registraci elektrické srdeční aktivity umožňují studovat srdeční aktivitu na několika úrovních detailnosti, od jednotlivé buňky po celý orgán. Elektrická aktivita izolovaného srdce je v této práci registrována pomocí třísvodového elektrogramu. Dále je elektrická aktivita malé skupiny srdečních buněk z levé komory registrována optickou metodou.

Optická metoda umožňuje záznam AN srdečních buněk s vysokým časovým i prostorovým rozlišením, a přitom její použití nevyžaduje mechanickou intervenci s měřenou tkání. Z těchto důvodů je optická metoda nejvhodnější metodou pro záznam AN srdečních buněk a její použití je preferováno řadou kardiologických experimentálních pracovišť [4], [5], [6], [7], [8], [9], [10], [11].

Na druhou stranu je použití optické metody svázáno s výskytem pohybového artefaktu (PA). PA představuje soubor jevů způsobených pohybem srdce, které nepříznivě ovlivňují průběh zaznamenávaného AN. PA znehodnocuje tvar registrovaného AN, znesnadňuje identifikaci jeho charakteristických průběhů, a v některých případech identifikaci zcela znemožňuje. Cílem této práce je odstranění, nebo alespoň významné potlačení PA.

V širším pojetí se práce zabývá způsobem registrace elektrické aktivity srdečních buněk optickou metodou (kapitola 3). Navazuje tak na práce popisující konstrukční řešení aparatury pro záznam AN optickou metodou [12], [9], interakci napěťově citlivých barviv se srdeční tkání [13], [14], a vlivu barviva na jednotlivé savčí druhy, [15], [16]. Jádrem práce tvoří využití metody nezávislých komponent (ICA) pro odstranění PA (kapitola 12) a srovnání variant ICA (kapitola 13 a 14) s ohledem na specifika optických signálů. Schopnost metody ICA odstranit PA je ověřena (kapitola 15) na simulovaných i reálných datech, a v práci je rovněž ověřena efektivita a robustnost ICA (kapitola 15.3). Poslední kapitoly (kapitoly 16 a 17) se věnují zhodnocení celé disertační práce.

2 ZÁZNAM ELEKTRICKÉ AKTIVITY IZOLOVANÉHO SRDCE

Kardiologický výzkum lze provádět na izolovaných buňkách, buněčných monokulturách, i na celém srdci. Základní kardiologický výzkum je prováděn na izolovaných srdcích laboratorních zvířat. Použití izolovaných srdcí umožňuje pochopit komplexní elektrické projevy srdce díky možnosti testovat vliv experimentálních podmínek a farmakologických přípravků. Význam kardiologického výzkumu na izolovaných srdcích v experimentálních podmínkách je akcentován častým výskytem srdečního selhání, jenž v roce sepsání disertační práce představuje nejčastější příčinu úmrtí ve vyspělých zemích [3].

Výzkum elektrofyzologie srdce je podmíněn kvalitním záznamem jeho elektrické aktivity. Stávající metody záznamu jsou proto optimalizovány a zároveň jsou hledány nové metody registrace elektrických srdečních projevů. Historickým vývojem byly záznamové metody zdokonaleny z pouhé registrace elektrických proudů Matteuccium v roce 1842 po současné přístupy umožňující simultánně zaznamenávat elektrickou aktivitu srdce s vysokým prostorovým i časovým rozlišením [2], [17]. Současné metody umožňují zaznamenat elektrický signál izolovaného srdce v řádu desítek minut až hodin [18].

Pro snímání elektrické aktivity srdečních buněk lze využít skleněné mikroelektrody zavedené do izolované buňky [19], [20], přísavné elektrody [1], nebo plovoucí elektrody [1]. Žádná z těchto metod však není ideální pro snímání kontrahujícího se izolovaného srdce, protože pohyb srdeční stěny a kontrakce jednotlivých srdečních buněk znemožňují kvalitní fixaci elektrod [4]. To výrazně limituje jejich použití. Kvalita zaznamenaných signálů navíc do značné míry závisí na zručnosti experimentátora, který fixuje elektrody.

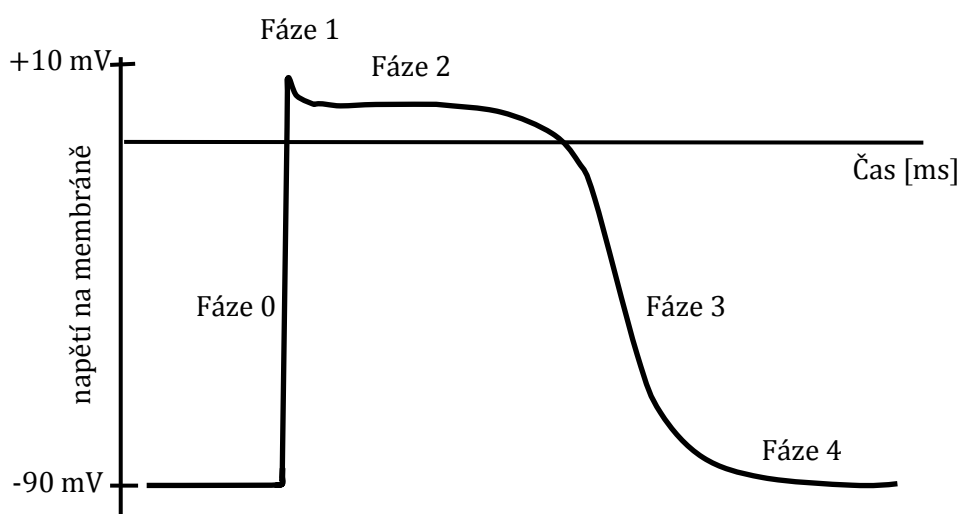
Elektrická aktivita malé skupiny buněk levé srdeční komory, která je předmětem výzkumu v této studii, může být alternativně zaznamenána optickou metodou. Optická metoda, popsaná detailně v kapitole 2.2, překonává výše popsaná omezení.

První záznam AN z povrchu epikardu optickou metodou provedl Salama a Morad na žabím srdci [21], čímž autoři dokázali, že záznam AN optickou metodou může být alternativou k záznamu AN pomocí mikroelektrod. Postupně následovaly studie, využívající optický záznam elektrické aktivity jednotlivých buněk [22], tkání [23] a celého srdce [24]. Rozvoj fotodetektorů umožnil simultánní záznam z více srdečních buněk, což vedlo k mapování šíření vzruchu myokardem [5]. Ještě později, díky pokroku ve vývoji optických vláken, bylo možné zaznamenat elektrickou aktivitu srdce intramurálně [25], [19]. První optické mapování lidského srdce provedl Efimov [26], v současné době je prováděno skupinou Krishnana [27]. Již nyní je optická metoda ojediněle používána pro experimenty prováděné na lidských srdcích po transplantaci. Dá se předpokládat, že využití optického snímání akčního napětí bude dále hrát významnou roli ve studiích buněčných mechanismů arytmií a umožní tak překlenutí vědomostní mezery mezi makroskopickou aktivací srdeční stěny a elektrofyzologií buněčných kanálů [28], [29], [30], [31], [32]. V této práci je optická metoda použita pro záznam AN.

2.1 Akční napětí

AN vyjadřuje časově podmíněné elektrické jevy na membráně buňky. Tyto jevy mají pravidelný průběh, opakující se v každé repetici AN. Průběh AN je determinován iontovými proudy, tekoucími skrze membránu buňky. Iontové proudy vzájemně utváří výslednou podobu křivky AN a tvar AN proto odráží elektrofyziologické jevy v srdci [1]. Neobvyklý tvar AN může reflektovat patologické změny v srdeční aktivitě. Záznam a analýza AN proto představuje významnou oblast výzkumu v experimentální kardiologii [33].

V odborné literatuře se ustálil popis AN pomocí pěti úseků, takzvaných fází. Fáze jsou zakresleny na obrázku (Obrázek 2.1) a popsány v následujících odstavcích.



Obrázek 2.1: Průběh AN. Převzato a upraveno z [1].

Fáze nula

V klidovém stavu buňky je většina draslíkových kanálů otevřena, zatímco sodíkové kanály jsou uzavřeny. Depolarizace membrány na hodnotu membránového napětí přibližně $U_m = -60\text{mV}$ způsobí otevření rychlých, napětově řízených, sodíkových kanálů [34]. Těmi do buňky vnikne velké množství sodíku a vytvoří se tak základ pro vyvolání AN [1].

Zvýšení koncentrace sodíku uvnitř buňky ještě více depolarizuje membránu na hodnotu okolo $U_m = +20\text{mV}$ [35], čímž se otevrou pomalé, napětově řízené, vápníkové kanály. Tyto kanály jsou umístěny jak v sarkolemě, tak v sarkoplazmatickém retikulu. Vápníkové ionty se vyplaví do vnitrobuněčného prostředí, kde jejich koncentrace prudce vzroste. Vyplavení vápníkových iontů podnítlí kontrakci srdečních buněk. Ve stejném čase se sníží propustnost membrány pro draslíkové ionty v důsledku uzavření draslíkových kanálů. Depolarizační fáze je rychlá (v řádu milisekund) a její napětíová úroveň je tak velká, že je schopná aktivovat sousední buňky [1]. Průběh fáze nula je zobrazen na obrázku (Obrázek 2.1).

Fáze jedna

Krátce po otevření sodíkových kanálů dojde opět k jejich zavření. Zároveň dojde

k repolarizaci způsobené draslíkovým kanálem, který produkuje přechodný proud směřující ven z buňky. Tyto dvě události vytvoří charakteristický překmit v AN [35]. Průběh fáze jedna je zobrazen na obrázku (Obrázek 2.1).

Fáze dva

Tvar AN srdečních buněk je specifický svou druhou fází, takzvanou plató. Membránové napětí v této fázi zůstává víceméně konstantní a udržuje se na hodnotě napětí blízké té, kterou dosáhlo na konci fáze jedna. Obvykle se tato hodnota pohybuje kolem $U_m = 0\text{mV}$. Fáze plató je formována depolarizačním vápníkovým proudem. Kromě něj teče přes membránu malý repolarizační proud draslíku. Vzájemně jsou oba proudy vyvážený a tvar AN proto zůstává ve fázi dvě konstantní.

Doba trvání plató je poměrně dlouhá. Trvá asi 200 – 250 ms [36], případně 200 – 350 ms [37], [36]. V průběhu plató buňka nereaguje na vzruchy sousedních buněk, což brání vzniku patologických rychlostí kontrakce srdce. Délka plató také určuje maximální tepovou frekvenci [37]. Průběh fáze dva je zobrazen na obrázku (Obrázek 2.1).

Fáze tři

Po poměrně dlouhé době plató se opět plně otevřou draslíkové kanály a začne aktivní depolarizace. Otevření draslíkových kanálů umožní iontům draslíku difundovat po svém koncentračním gradientu pryč z buňky. Ve stejný okamžik se začnou uzavírat vápníkové kanály. Dominantním proudem zůstává draslíkový proud tekoucí z buňky ven, který obnoví záporné klidové membránové napětí s úrovní napětí $U_m = -90\text{ mV}$. Průběh fáze tři je zobrazen na obrázku (Obrázek 2.1).

Fáze čtyři

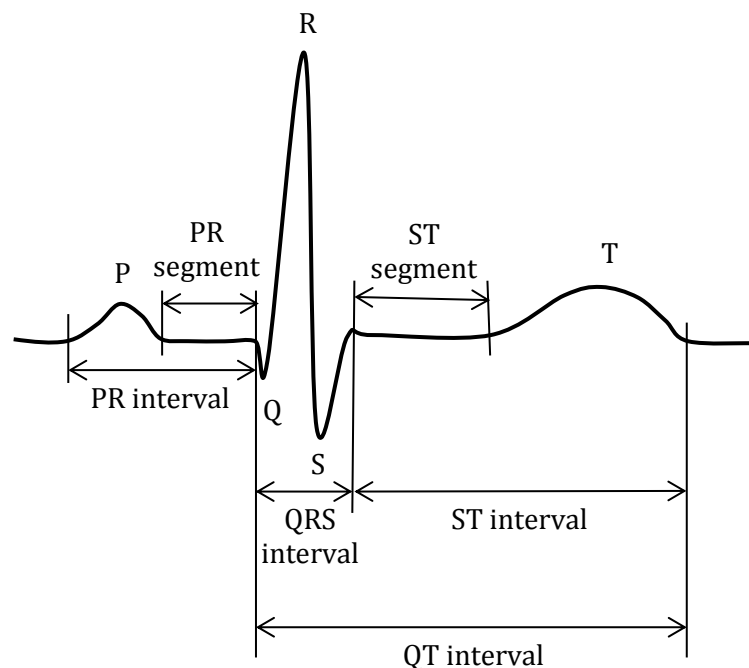
Schopnost srdečních buněk reagovat na nově přichozí vzruch závisí na době, která uplynula od poslední kontrakce. Tato doba se nazývá refrakterní perioda, a definuje čtvrtou fázi průběhu AN. Existují dva typy refrakterních period [38]:

- Absolutní refrakterní perioda, což je časový úsek, během něhož nelze vyvolat nový AN a to ani libovolně velkým stimulačním impulsem. Je to dáno tím, že membrána není dostatečně repolarizovaná a sodíkové kanály se ještě zcela nenacházejí v klidovém stavu [38], [1].
- Relativní refrakterní perioda, během níž lze AN sice vyvolat stimulačním impulsem, ale tento impuls musí mít vyšší úroveň napětí než v případě, kdy by byla stimulace provedena v klidové fázi AN (fáze 0).

2.2 Elektrogram

Elektrogram je záznam elektrické aktivity srdce. Elektrogram reprezentuje součet AN, šířících se myokardem, snímáný v konkrétním okamžiku z povrchu izolovaného srdce [39].

Elektrická aktivita srdečních síní a komor se na elektrogramu manifestuje výchylkami od izoelektrické linie, které mohou nabývat tvar vln či komplexů. Tyto výchylky jsou označovány velkými písmeny latinské abecedy P až T. Záznam elektrogramu jednoho srdečního cyklu s popisem charakteristických vln a komplexů zobrazuje obrázek (Obrázek 2.2).



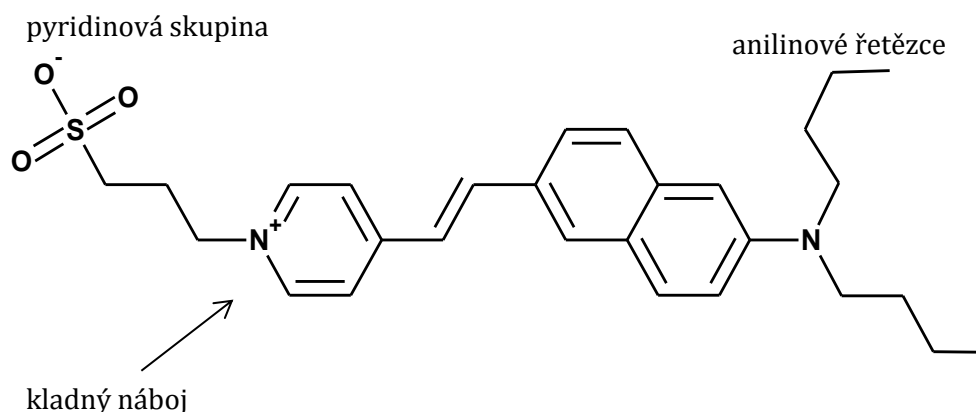
Obrázek 2.2: Záznam elektrogramu jednoho srdečního cyklu s popisem charakteristických vln a komplexů.

Tvar elektrogramu je podobný elektrokardiogramu. Vzájemně se však liší tím, že elektrogram je záznam elektrické srdeční aktivity izolovaného srdce z povrchu srdce, zatímco elektrokardiogram je záznam elektrické srdeční aktivity registrovaný přes nehomogenní tkáňové struktury těla snímaného subjektu. Tvar elektrogramu i elektrokardiogramu má diagnostickou hodnotu, neboť změny v jejich tvarech vypovídají o způsobu šíření elektrických vzruchů myokardem.

3 OPTICKÁ METODA

Optická metoda je metoda bezkontaktního záznamu AN. Jejím principem je převod změny membránového napětí buňky na změnu optických vlastností registrovaného světelného signálu [32]. Převod zajišťuje napětově citlivé barvivo (VSD; z anglického voltage sensitive dye). Molekuly VSD navázané na srdeční tkáň při osvětlení excitačním světlem emitují světlo, které je zaznamenáváno fotodetektozem [18]. Tím je získáván samotný záznam.

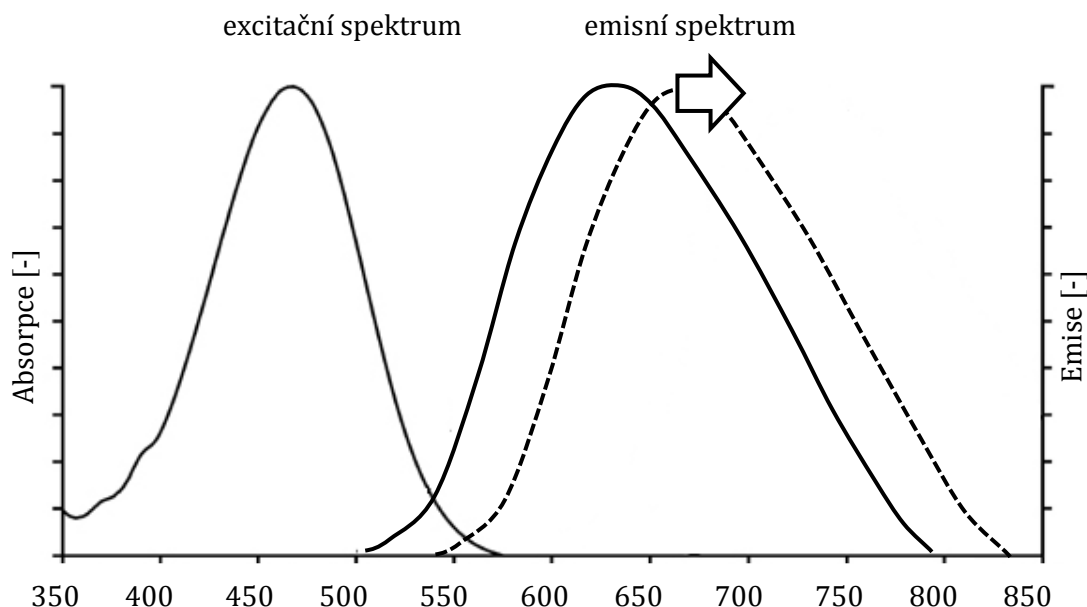
Napětově citlivé barvivo je organická molekula, sloužící jako mikroskopický převodník napětí na optické vlastnosti molekuly VSD [40], [41]. Převod napětí na optické vlastnosti molekuly umožňuje několik mechanismů VSD [41]. V této práci je využíváno VSD označované zkratkou di-4-ANEPPS [31], plným názvem 4-[beta-[2-(di-n-butylamino)-6-naphthyl]vinyl]pyridinium. VSD di-4-ANEPPS využívá principu elektrochromismu [31], [17], [18], proto bude vysvětlen pouze ten. Ostatní mechanismy jsou přehledně popsány například v [28], [5], [42], [43], [44], [45], [46]. Elektrochromismus je proces změny spektra emitovaného světla způsobené změnou prostorové konformace molekuly barviva. Molekula di-4-ANEPPS má podlouhlý tvar, obsahující na jednom konci pyridinovou skupinu, a na druhém anilinové řetězce, viz obrázek (Obrázek 3.1).



Obrázek 3.1: Molekulární struktura napětově citlivého barviva di-4-ANEPPS. Převzato a upraveno z [31].

V normálním stavu je v molekule di-4-ANEPPS vázán kladný náboj poblíž pyridinové skupiny. Při excitaci molekuly barviva světlem vhodné vlnové délky se kladný náboj přemístí na druhý konec molekuly směrem k anilinovým řetězcům. Přemístěný náboj elektricky reaguje s vnějším elektrickým polem buněčné membrány. Molekula je navržena tak, aby se k vnějšímu poli orientovala paralelně. Paralelní orientaci zajišťují oba konce molekuly, hydrofilní sulfátová skupina, a lipofilní hydrokarbonové řetězce. Tyto řetězce zajišťují navázání barviva k membráně, hydrofilnost a lipofilnost konců molekuly zajišťují její žádoucí orientaci. V polarizované membráně přesun náboje způsobí snížení energetického rozdílu mezi klidovým a excitovaným stavem molekuly. Energetický rozdíl je úměrný membránovému napětí. Energetický rozdíl tak určuje vlnovou délku emisního světla vyzářeného při návratu molekuly z excitovaného do klidového stavu. Změna energie se

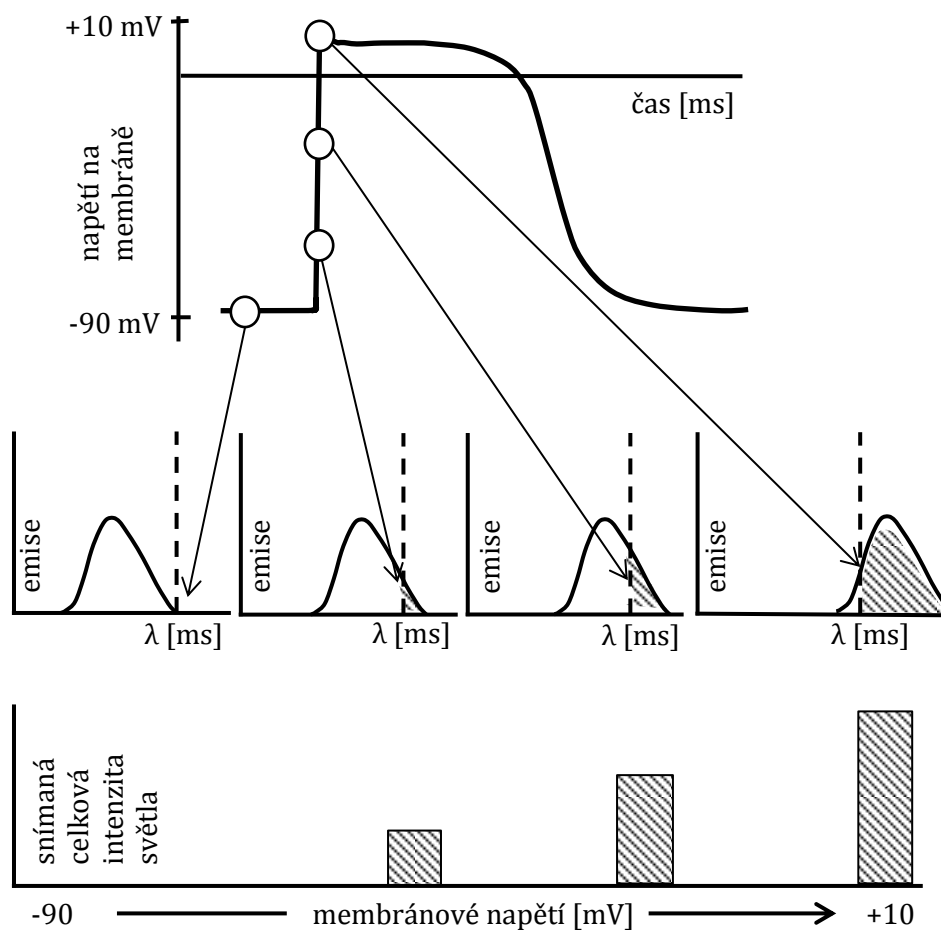
projeví posuvem emisního spektra. Posuv spektra je zobrazen na obrázku (Obrázek 3.2). Emitované světlo je snímáno fotodetektorem, čímž je získán optický záznam změny membránového napětí srdeční buňky.



Obrázek 3.2: Excitační a emisní spektrum di-4-ANEPPS, převzato a upraveno z [47].

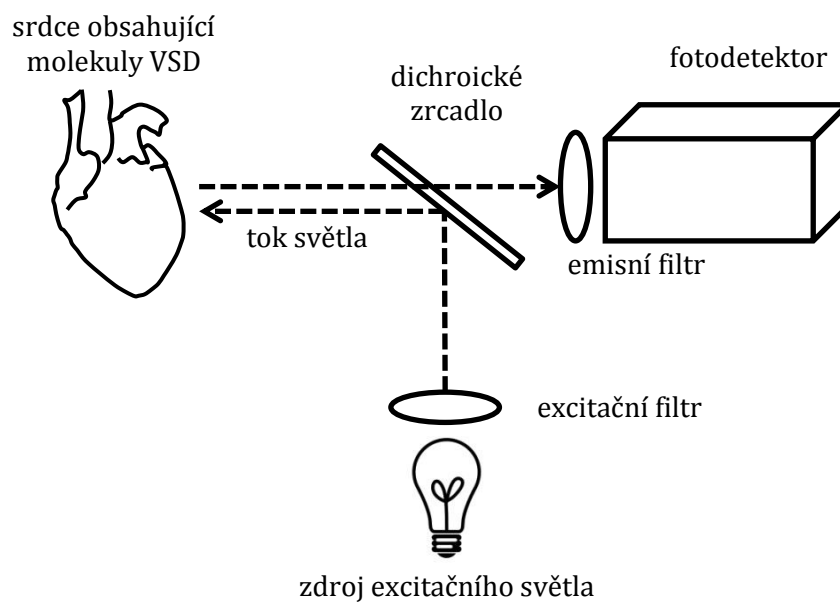
VSD di-4-ANEPPS se vyznačuje několika vlastnostmi, umožňujícími jeho využití pro záznam elektrické aktivity srdečních buněk [42], [28]. Změna fluorescence di-4-ANEPPS během depolarizace AN dosahuje 8-15% základní fluorescence [31]. Molekuly tohoto barviva mají schopnost navázat se na buněčnou membránu srdeční buňky a vydržet zde 2-4 hodiny [31]. Barvivo lineárně mění své optické vlastnosti se změnou membránového napětí buňky [31]. Reakce di-4-ANEPPS je dostatečně rychlá, aby mohla reflektovat rychlé změny AN [31], [17]. Barvivo reaguje jen na změnu napětí, nikoliv na změny jiných podmínek, jako jsou iontové koncentrace, membránové proudy nebo vodivost membrány. Molekuly barviva neovlivňují fyziologii srdečních buněk, ani příliš neovlivňují viabilitu buněk. V případě použití VSD pro měření izolovaného srdce musí být toxicita barviva alespoň natolik malá, aby proces barvení neovlivnil počet viabilních buněk, což di-4-ANEPPS splňuje. Zároveň poskytuje di-4-ANEPPS relativně stabilní optický signál, u kterého se projevuje v pouze nepatrné míře vliv fotovysvícení [13]. (Fotovysvícení je jev, během něhož díky internalizaci VSD v tkáni dochází k postupnému snižování intenzity emisního světla.) Souhrn těchto vlastností činí z di-4-ANEPPS vhodné VSD pro kardiologický experimentální výzkum.

Snímací systémy využívající optickou metodu jsou navrženy tak, aby barvivo bylo excitováno na požadované vlnové délce, a zároveň aby mohl být zaznamenán posuv spektra emitovaného světla [32]. Emisní posuv je zaznamenán jako změna celkové intenzity světla ve spektrálním pásmu vymezeném optickým filtrem. Situaci ilustruje obrázek (Obrázek 3.3), na kterém je pro jednotlivé úrovně AN schematicky zakreslen posuv emisního světla. Vyznačená plocha pod křivkou emisního spektra odpovídá celkové intenzitě světla, která je v čase zaznamenávána a tím je získáván průběh AN.

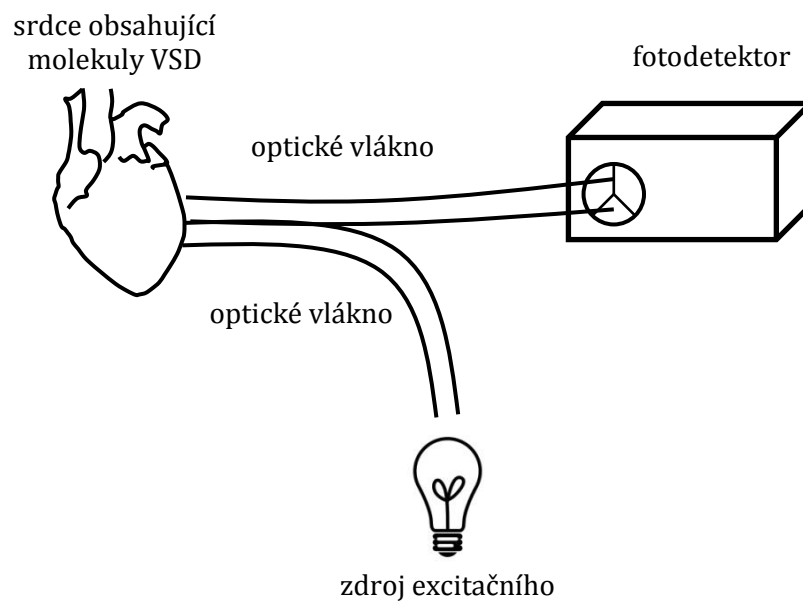


Obrázek 3.3: Změna celkové intenzity světla ve spektrálním pásmu vymezeném optickým filtrem při změně akčního napětí.

Konstrukce snímacího systému může být řešena pomocí soustav polopropustných zrcadel, čoček a optických filtrů, jak schematicky ilustruje obrázek (Obrázek 3.4). Alternativně je možné konstrukci snímacího systému realizovat s využitím optických vláken, kterými jsou světelné paprsky vedeny ze zdroje excitačního světla k myokardu a z myokardu k fotodetektoru. Konstrukce využívající optická vlákna je schematicky ilustrovaná obrázkem (Obrázek 3.5).



Obrázek 3.4: Kontrukční řešení snímacího systému využívajícího dichroické zrcadlo.



Obrázek 3.5: Kontrukční řešení snímacího systému využívajícího optická vlákna.

4 POHYBOVÝ ARTEFAKT

Pohybovým artefaktem (PA) je označováno nežádoucí zkreslení optického záznamu elektrické aktivity srdečních buněk způsobené kontrakcí srdce [48], [7]. PA znehodnocuje optické záznamy v takové míře, že v současnosti představuje nejvýznamnější limitaci použití optické metody.

4.1 Vznik pohybového artefaktu

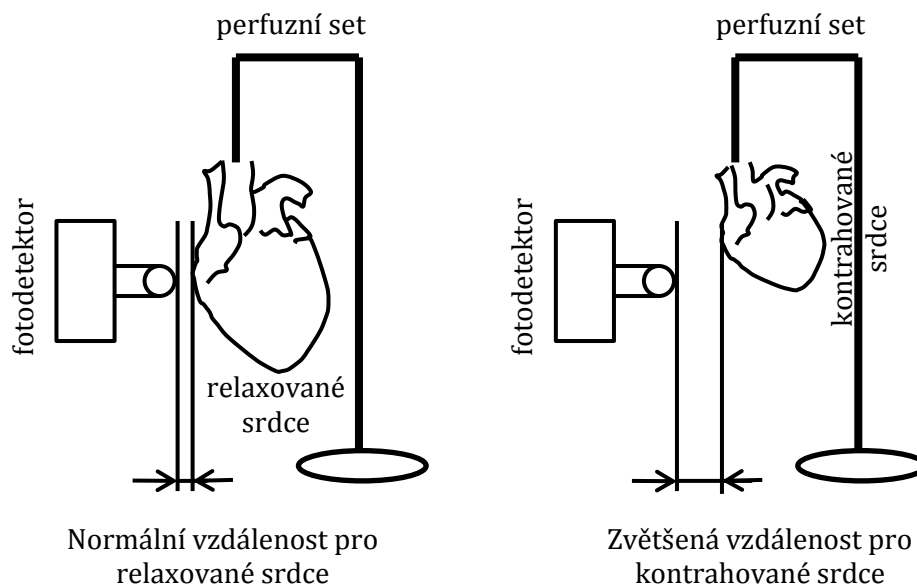
Pohybový artefakt vzniká pohybem srdeční stěny. Pohyb srdeční stěny je nepredikovatelný, protože je určený fyziologickými (případně patofyziologickými) a následně mechanickými procesy v srdci. Srdeční stěna se navíc pohybuje v trojrozměrném prostoru a poloha kardiomyocitů vzhledem k fotodetektoru se mění. Každý kardiomyocit srdeční stěny nabarvený VSD se po excitaci chová jako zdroj emisního světla s kulovou vlnoplochou šíření světla. Tento zdroj světla se však pohybuje. Tím nežádoucím způsobem moduluje intenzitu světla dopadajícího na fotodetektor, u níž by bylo žádoucí, aby reflektovala pouze změnu membránového napětí. V takovém případě fotodetektor snímá dvouparametrické zorné pole. Jeho primární složku tvoří žádoucí změna intenzity emisního světla úměrná AN. Sekundární složku tvoří nežádoucí změny celkové intenzity světla způsobené souhrnem faktorů tvořících PA.

Na vzniku PA se podílí několik faktorů, které dosud nebyly zcela objasněny a ani nebyl uzavřen jejich výčet. PA vzniká při kontrakci srdce především díky změně vzdálenosti mezi srdeční stěnou a fotodetektorem a díky natočení srdeční stěny vzhledem k fotodetektoru. Méně významně k němu přispívá několik dalších mechanismů. Faktory, přispívající ke vzniku PA, jsou popsány v následujících podkapitolách 4.1.1. až 4.1.4.

4.1.1 Proximálně-distální změna vzdálenosti srdeční stěny od fotodetektoru

Během kontrakce srdce dochází k přiblížení nebo naopak oddálení srdeční stěny od fotodetektoru. Změna vzdálenosti se projeví změnou snímané intenzity světla.

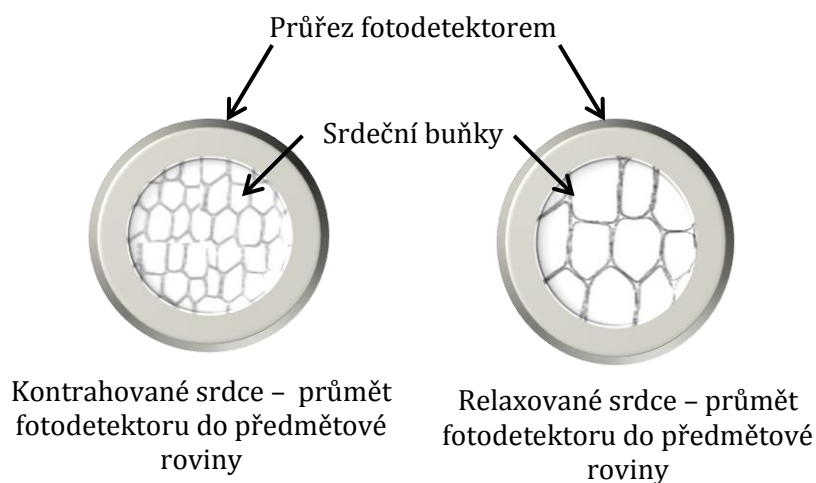
Proximálně-distální změnu vzdálenosti ilustruje obrázek (Obrázek 4.1). Kontrahující se srdce zmenšuje svůj objem a tím se srdeční stěna vzdaluje od fotodetektoru. Intenzita záření bodového zdroje, kterým jsou molekuly VSD, klesá podle Keplerova vzorce s druhou mocninou narůstající vzdálenosti [49], a tato nežádoucí modulace intenzity světla deformuje záznam AN.



Obrázek 4.1: Proximálně-distální změna vzdálenosti stěny srdce od fotodetektoru.

4.1.2 Změna počtu molekul VSD v zorném poli fotodetektoru

Změna počtu molekul VSD v zorném poli fotodetektoru souvisí s pohybem srdeční stěny v rovině paralelní k zornému poli fotodetektoru, viz obrázek (Obrázek 4.2). Velikost zorného pole je konstantní a smrštění srdeční stěny způsobí, že se do zorného pole dostane více VSD molekul a fotodetektor zachytí více emisního světla. Kromě toho, že se zvýší počet nabarvených kardiomyocytů v zorném poli fotodetektoru, dochází díky šroubovitě trajektorii kontrakce myokardu také k tomu, že se do zorného pole dostávají jiné kardiomyocyty, než ty, které v něm byly před započítáním pohybu. Pokud je srdeční tkáň nabarvena nehomogenně, dochází k dalšímu nežádoucímu příspěvku ke změně celkové intenzity světla. Části tkáně obsahující různou koncentraci di-4-ANEPPS totiž emitují světlo s různou intenzitou.



Obrázek 4.2: Zvýšení počtu di-4-ANEPPS nabarvených buněk v rovině fotodetektoru během kontrakce izolovaného srdce.

4.1.3 Optické vlastnosti srdeční tkáně

PA může vznikat díky nestejně struktuře srdeční tkáně [7]. Optické vlastnosti srdeční tkáně, jako jsou odrazivost, rozptyl nebo absorpce světla, nejsou v celém objemu srdce homogenní [50]. Proto jakékoliv i mírné natočení nebo posunutí srdeční stěny způsobuje nežádoucí změny v zaznamenaném optickém signálu.

4.1.4 Prostorová orientace molekul barviva

U některých VSD dochází ke vzniku PA způsobeného změnou prostorové orientace molekuly barviva. VSD se dají podle mechanismu spektrální citlivosti na AN rozdělit na čtyři skupiny [28], přičemž pro jednu z nich je změna prostorové orientace molekuly zásadní, a pro tři další nevýznamná. VSD di-4-ANEPPS využívá princip elektrochromismu, pro který je vliv změněné geometrie srdečních buněk nevýznamný.

4.2 Matematický model pohybového artefaktu

PA je důsledkem náhodných jevů, které vzájemně interferují. Z toho důvodu je obtížné PA matematicky popsat. Zjednodušeně je však možné PA matematicky popsat ve smyslu přičtení fluorescence zapříčiněné pohybem k fluorescenci determinované membránovým napětím. Tento matematický popis zavedl Tai [51] jako jednoduchý model PA.

Matematický model PA vychází z konstrukce záznamových systémů pro optickou metodu. Ty jsou konstruovány tak, že světlo emitované molekulou VSD prochází optickým filtrem, a filtrovaná část emisního světla je snímána fotodetektozem. Fotodetektor integruje intenzitu světla všech vlnových délek propuštěných filtrem. Celková intenzita světla, dopadající na fotodetektor ve spektru vymezeném použitým filtrem, je určena vztahem:

$$I_{ds}(t) = I_{es}(t)(E_s + A_s) \quad 4.1$$

kde $I_{ds}(t)$ je intenzita detekovaného světla ve spektrálním rozsahu označeném indexem s , $I_{es}(t)$ představuje intenzitu excitačního světla, proměnná E_s vyjadřuje příspěvek emisního světla k intenzitě detekovaného světla a proměnná A_s označuje příspěvek nežádoucí autofluorescence zaznamenávané scény k intenzitě detekovaného světla. Vztah (4.1) platí při předpokladu lineární závislosti obou příspěvků, E_s a A_s , na intenzitě excitačního zdroje $I_{es}(t)$. Tento předpoklad je pro di-4-ANEPPS splněn.

Složka E_s je úměrná aktuální hodnotě membránového napětí, ale je také ovlivněna pohybem srdeční stěny. Navíc díky fotovysvícení VSD intenzita detekovaného světla postupně nelineárně klesá s narůstající dobou záznamu [13]. (Fotovysvícení je pomalé snižování intenzity emisního světla během doby excitace barviva. Dynamika a míra tohoto jevu je závislá na konkrétním použitém barvivu a na způsobu jeho aplikace do tkáně.) Každý z těchto faktorů lze označit jako časově závislou funkci a proměnnou E_s pak rozvést vztahem:

$$E_s = B_s(t)P_s(t)F_s(t) \quad 4.2$$

kde E_s je příspěvek světla, úměrný aktuální hodnotě membránového napětí, $B_s(t)$ označuje emisi VSD úměrnou elektrickým projevům srdeční buňky, $P_s(t)$ nepříznivou modulaci emise VSD způsobenou pohybem srdeční stěny a $F_s(t)$ označuje pomalé snižování emise VSD způsobené fotovysvícením.

Složku $B_s(t)$ lze modelovat lineárním modelem prvního řádu [52]:

$$B_s(t) = C_s[1 + c_s N(t)] \quad 4.3$$

kde $B_s(t)$ označuje emisi VSD úměrnou elektrickým projevům srdeční buňky, C_s a c_s jsou na vlnové délce závislé konstanty a $N(t)$ je membránové napětí. Konstanta c_s dosahuje hodnot 0 - 0,1 na 100mV membránového napětí [8].

Stejným způsobem lze modelovat složku zahrnující vliv pohybu. Nejjednodušší matematická reprezentace této složky je opět lineární model prvního řádu [52]:

$$P_s(t) = 1 + d_s P(t) \quad 4.4$$

kde $P_s(t)$ je složka vyjadřující vliv pohybu, d_s je konstanta závislá na vlnové délce a $P(t)$ vyjadřuje pohyb srdce. V případě, že v záznamu není pohyb vůbec obsažen, je jeho vliv konstantní, což je vyjádřeno jako $P(t) = 1$.

Složka $F_s(t)$ popisuje vliv fotovysvícení, tj. pomalé snižování intenzity emisního světla během doby excitace barviva. Dynamika a míra tohoto jevu je závislá na konkrétním použitém barviva a na způsobu jeho aplikace do tkáně.

5 ZPŮSOBY OMEZENÍ POHYBOVÉHO ARTEFAKTU

Optický záznam elektrické aktivity izolovaného srdce je vždy provázen PA, protože kontraktilita srdce je jednou ze základních vlastností srdce [7]. Vývoj metod pro odstranění PA má tudíž zásadní význam pro kardiologické studie.

Odstranění nebo alespoň potlačení PA je v současnosti dosahováno následujícími skupinami metod [50]:

- farmakologickými blokátory pohybu, nebo snížením obsahu extracelulárního vápníku [53],
- mechanickým omezením pohybu srdce,
- technikami zpracování signálu (obvykle formou následného zpracování zaznamenaných dat kvůli výpočetní náročnosti použitých technik).

První dvě skupiny technik přímo zabráňují pohybu srdce. Třetí technika pohyb srdce nijak neomezuje a PA odstraňuje až ze zaznamenaných optických signálů. Výběr vhodného způsobu potlačení PA závisí na typu studie. Pokud je prioritou okamžitý přehled o AN, studovaný v reálném čase, je nutné použít některou z prvních dvou technik. Naopak při potřebě zachovat co možná nejvěrnější fyziologické podmínky srdce je vhodnější použít techniky zpracování signálu. V experimentálních studiích se používají výše popsané metody jednotlivě i jako kombinace několika z nich. Častá je například kombinace farmakologických blokátorů s technikou zpracování signálu. Současným využitím několika metod lze spojit jejich výhody.

Volba metody pro potlačení PA závisí také na době záznamu AN. Krátkodobá měření trvající sekundy až desítky sekund nemění výrazně fyziologii zkoumaného srdce. Z výše uvedených metod se pro krátkodobá měření hodí všechny výše uvedené metody používané pro odstranění PA. Dlouhodobé měření trvající minuty až hodiny však vyžaduje použití technik zpracování signálu, které nemají efekt na fyziologii srdce ani z dlouhodobého hlediska.

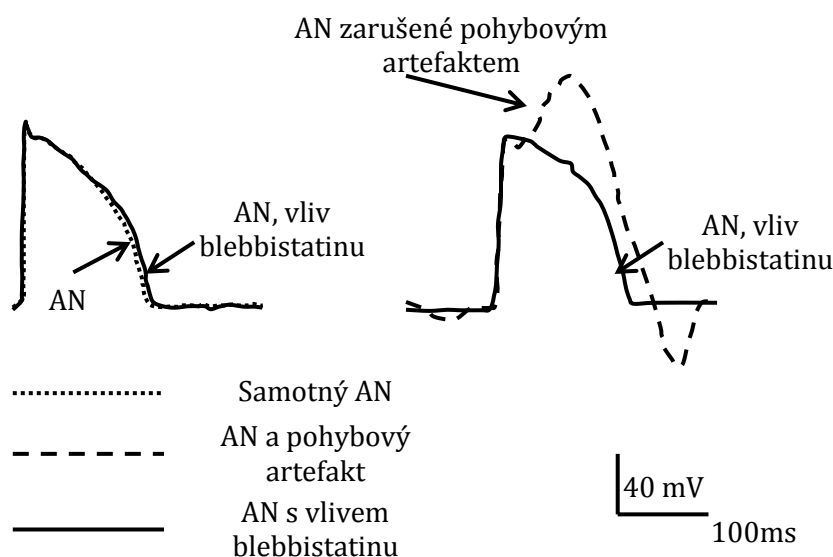
5.1 Farmakologické blokátory pohybu

Farmakologické blokátory pohybu omezují přenos elektrického vzruchu na kontraktilní aparát buňky a proto dochází k potlačení kontrakce srdce. Optický záznam elektrické aktivity srdce je pak přímým záznamem AN. Mezi nejčastěji používané farmakologické blokátory pro potlačení srdeční kontraktility patří 2,3-butandion monoxim (BDM), cytochalasin-D a blebbistatin [48].

- BDM je nekompetitivní inhibitor myozinové ATPázy, který narušuje vazbu mezi excitací a kontrakcí [54]. Byl jedním z prvních disociátorů použitých pro stabilizaci srdečního pohybu [48]. Jeho výhodou je, že způsobuje jen nepatrné změny v trvání a průběhu AN. Na druhou stranu má BDM mnoho nežádoucích vedlejších účinků. Při vyšších koncentracích ovlivňuje vápníkové transienty [55], [56] a vodivost některých membránových kanálů [57]. Změny způsobené BDM navíc podstatně závisí na způsobu preparace srdce, snímáním místa tkáně, a druhu zkoumaného zvířete, takže výsledky

nelze srovnávat mezi sebou.

- Cytochalasin-D je toxin, vázající se na F-aktinová vlákna, které narušuje a u nichž potlačuje polymeraci [58]. Tento inhibitor srdeční kontrakce je považován za efektivnější, než BDM [58]. Cytochalasin-D neovlivňuje délku AN [59], [60]. Jeho nevýhodou je však ovlivnění vlastností AN u hlodavců, a ovlivnění vazby intracelulárního vápníku. V experimentech v této práci se hlodavci používají, proto Cytochalasin-D není pro odstranění PA vhodný. U cytochalasinu-D bylo také dokázáno, že způsobuje vedlejší efekty v tkáňové elektrofyziologii [61].
- Blebbistatin je Fedorovem nedávno objevená molekula, sloužící jako selektivní a specifický inhibitor ATPázy spojené s druhou třídou myozinových izoform ve stavu nenapojeného aktinu [48], [62]. Fedorov zkoumal specifitu a účinnost blebbistatinu v podmínkách podobných podmínkám experimentů, z kterých pochází data analyzovaná v této práci [48]. Protože je blebbistatin nedávno objevenou molekulou, nejsou ještě zcela prozkoumány jeho vlastnosti. První studie však ukazují, že vliv blebbistatinu na fyziologii srdce je minimální [48], [63]. Při aplikaci blebbistatinu v srdeční tkáni hlodavců nebyl pozorován žádný efekt na morfologii AN. Navíc je vliv blebbistatinu na kontrakci srdce zcela reverzibilní. Blebbistatin nijak neovlivňuje tvar AN, zatímco zcela odstraňuje PA, což ilustruje obrázek (Obrázek 5.1). Blebbistatin se proto jeví jako nejvýhodnější z farmakologických blokátorů.



Obrázek 5.1: Vliv blebbistatinu na tvar AN (levá část obrázku) a potlačení pohybového artefaktu blebbistatinem (pravá část obrázku), převzato z [48] a upraveno.

Techniky použité k potlačení pohybu srdce zahrnují také snížení obsahu extracelulárního vápníku [53], nebo použití blokátorů vápníkových kanálů. Snížení pohybu je dosaženo perfuzí srdce inhibitory L-typu vápníkových kanálů, jako je například verapamil [28]. Metoda je vhodná jen pro experimenty nevyžadující detailní

analýzu tvaru AN. Inhibitory vápníkových kanálů totiž mění nefyziologicky dobu trvání AN [28]. Nelze je tedy použít pro studie, v nichž je potřeba analyzovat délku AN.

5.2 Mechanické omezení pohybu

Mechanickou fixací srdce lze potlačit, nebo i zcela omezit pohyb srdce. Mechanická restrikce je dosahována sevřením izolovaného srdce v kroužku [64], nebo přitisknutím srdce ke stěně vaničky, v níž je srdce umístěno [65], [66]. Při zkoumání prostorového šíření excitace srdcem pro účely mapování lze navíc využít přitlačnou skleněnou tabulku, jenž srdce rovněž fixuje [67], [68]. Tento způsob omezení pohybu byl úspěšně použit pro stabilizaci malých srdcí, jakými jsou myši, krysí a morčecí srdce [53]. Fyziologie srdce se zdá být neovlivněna [32], [5], [69], [11]. Na druhou stranu, v místech, kde je srdce přitisknuto ke stěně nebo kroužku, může docházet k zúžení nebo úplnému uzavření koronárních žil. Snížený průtok krve pak vyústí v lokální ischemii. Pro studium ischemických změn na izolovaném srdci proto tento způsob není vhodný.

5.3 Techniky zpracování signálu

PA může být odstraněn ze záznamů AN technikami pro zpracování signálu. Doba výskytu AN se časově překrývá s dobou výskytu PA, a stejně tak se překrývá frekvenční obsah AN a AP. Zpracování jednodimenzionálního optického signálu založené na některé z forem filtrace zaznamenaných dat proto neposkytuje uspokojivé výsledky. Z toho důvodu je použití technik zpracování signálu podmíněno speciálním konstrukčním řešením záznamové aparatury, umožňujícím snímat AP simultánně více snímači. Simultánní záznam umožňuje potlačit následujícími třemi metodami.

První možností odstranění PA z optického záznamu AN je využití metody sledování pohybu v dvoudimenzionálním záznamu scény. Pohyb srdeční stěny je určen např. pomocí sledování trajektorie charakteristických bodů snímané scény a následně jsou zaznamenané snímky slícovány tak, aby se tyto body překrývaly. Techniku sledování pohybu použil pro odstranění PA Švrček [70]. Sledování pohybu ve scéně spadá do oblasti zpracování obrazu, a podmínkou získání věrohodných dat je záznam emisního světla maticí fotodetektorů s dostatečně vysokým prostorovým rozlišením. Záznamové systémy s vysokým prostorovým rozlišením však obvykle mají nízké časové rozlišení. Časové rozlišení pak může být pro detailní záznam tvaru AN příliš nízké a proto nevyhovující.

Druhou možností odstranění PA ze záznamu AN je využití poměrové metody. Poměrová metoda je v současnosti patrně nejvyužívanějším způsobem odstranění PA v experimentální kardiologii. Poměrové metodě je věnována kapitola 6.

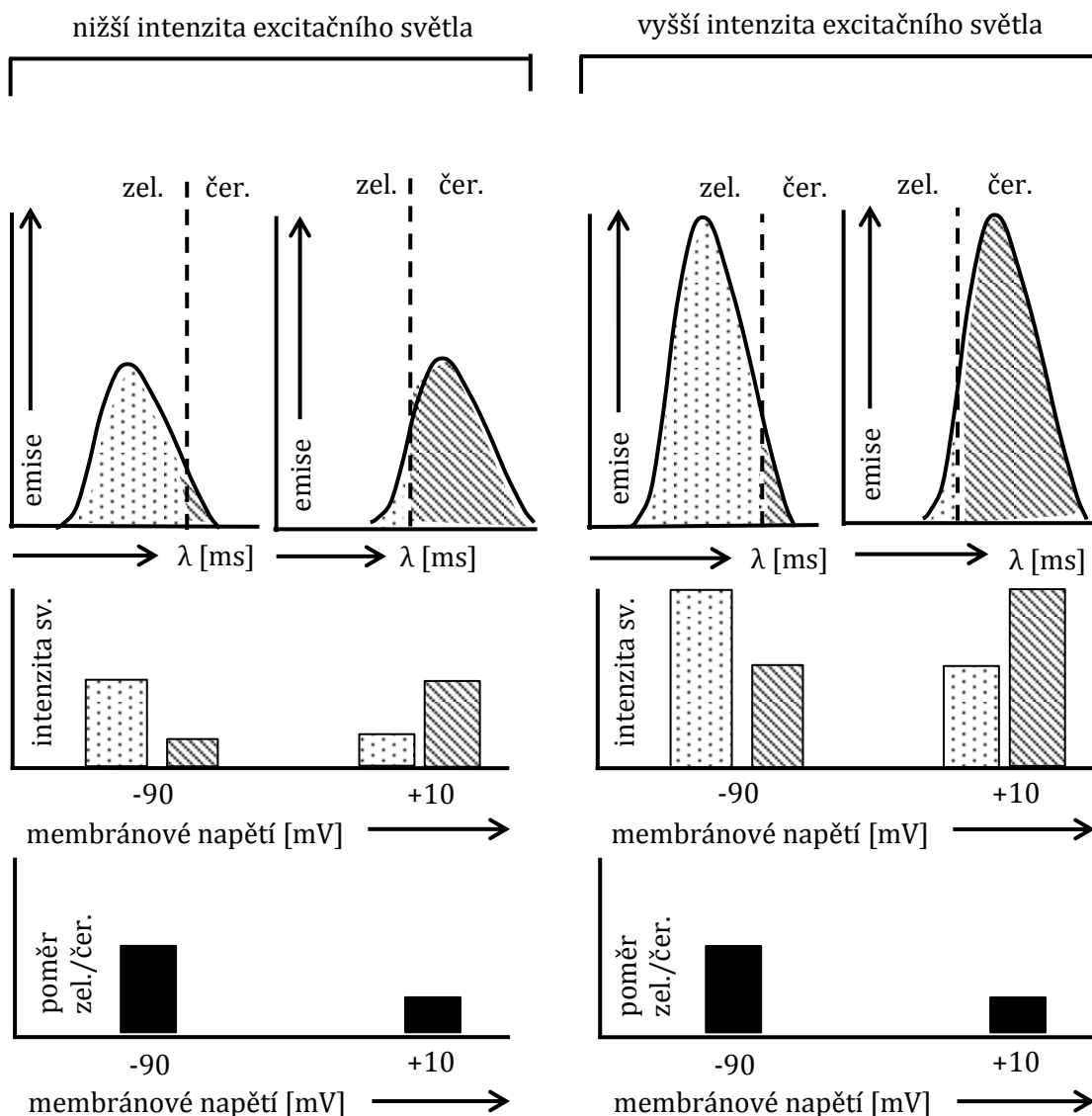
Třetí možností odstranění PA ze záznamu AN je využití metody nezávislých komponent, což je náplní kapitoly 7.

6 POMĚROVÁ METODA

Poměrová metoda je technika zpracování signálu využívající dva simultánní záznamy měřené veličiny. Poměrová metoda byla poprvé použita v roce 1989, v současnosti patří ve skupině technik pro zpracování optického signálu k nejčastěji používaným metodám k odstranění PA [71]. Poměrová metoda vychází ze simultánního záznamu stejné veličiny dvěma senzory. Podmínkou je, aby byla veličina zaznamenávána tak, aby její záznamy byly vzájemně opačné, tj. měly opačná znaménka. Poměrem zaznamenaných signálů je pak získán signál tvarově odpovídající původní zaznamenávané veličině.

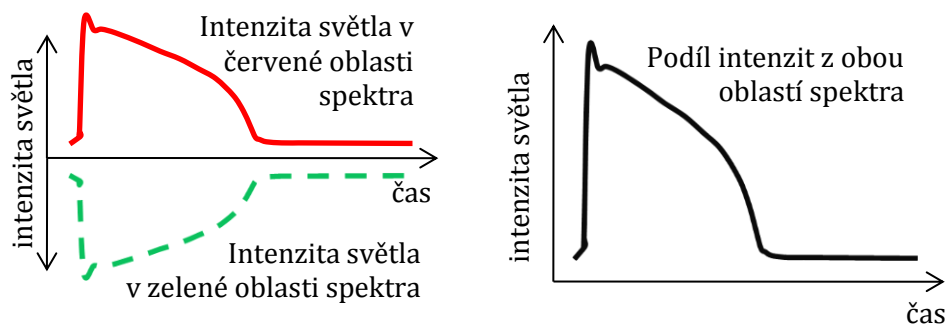
6.1 Princip poměrové metody

Poměrová metoda pro zpracování optických singálů využívá toho, že molekula VSD reaguje na zvýšení napětí na buněčné membráně posunem emisního spektra směrem k vyšším vlnovým délkám; tvarově ale spektrum zůstává nezměněno. Při záznamu poměrovou metodou je signál úměrný AN snímán simultánně ve dvou odlišných pásmech emisního spektra, definovanými propustnostmi optických filtrů. Posuv emisního spektra při depolarizaci buněčné membrány zobrazuje obrázek (Obrázek 6.1), který jej zobrazuje ve dvou podmínkách: v levé části obrázku je posuv spektra zobrazen pro nižší intenzitu excitačního světla, v pravé části obrázku je stejný posuv spektra zobrazen pro vyšší intenzitu excitačního světla. Z obrázku je patrné, že tvar spektra se nemění, mění se však velikost výchylky křivky spektra, neboť vyšší intenzita excitačního světla excituje více molekul VSD. Tím zároveň roste i celková intenzita světla snímaná jak v zelené, tak v červené spektrální oblasti. Celková intenzita světla v zelené i červené oblasti světla je schematicky znázorněna sloupcovým grafem v prostřední části obrázku. Sloupcový graf ukazuje, že se intenzity světla liší jak pro odlišné membránové napětí, tak pro odlišné excitační intenzity. Nezávislost snímané intenzity světla na velikosti excitační intenzity je dosažena výpočtem poměru mezi intenzitou světla v zelené a červené oblasti. To zobrazuje dolní část obrázku, z které je patrné, že vypočítaný poměr závisí pouze na velikosti membránového napětí, nikoliv na velikosti intenzity excitačního světla.



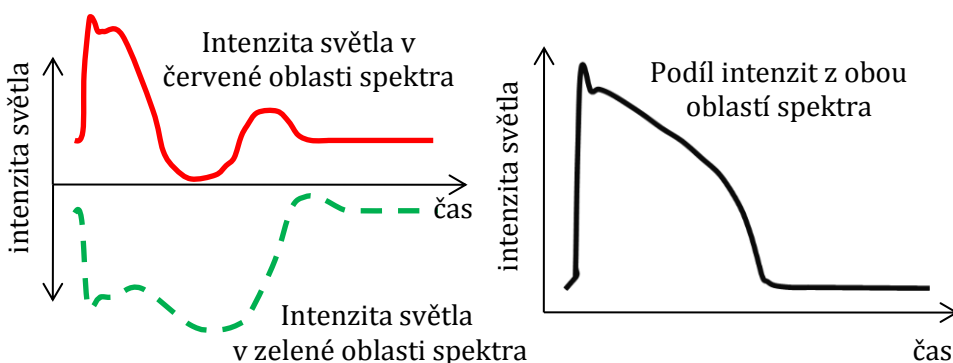
Obrázek 6.1: Princip poměrové metody. Ve směru shora dolů jsou zobrazena emisní spektra napěťově citlivého barviva; sloupcové grafy vyjadřující obsah plochy pod křivkou emisního spektra; sloupcové grafy vyjadřující poměr ploch v zelené a červené oblasti spektra. V levé části obrázku je situace vykreslena pro excitaci barviva nižší intenzitou excitačního světla, v pravé části obrázku pro excitaci vyšší intenzitou.

Vliv AN na VSD se projevuje v obou signálech opačně. V jednom spektrálním pásmu reaguje barvivo na zvýšení AN zvýšením intenzity emisního světla, což zobrazuje čárkovaný zelený průběh na obrázku (Obrázek 6.2, vlevo). V druhém spektrálním pásmu reaguje VSD snížením intenzity emisního světla, což zobrazuje červenou plnou čarou zakreslený průběh na (Obrázek 6.2, vlevo). Podílem obou signálů lze získat signál odpovídající změnám AN (Obrázek 6.2, vpravo).



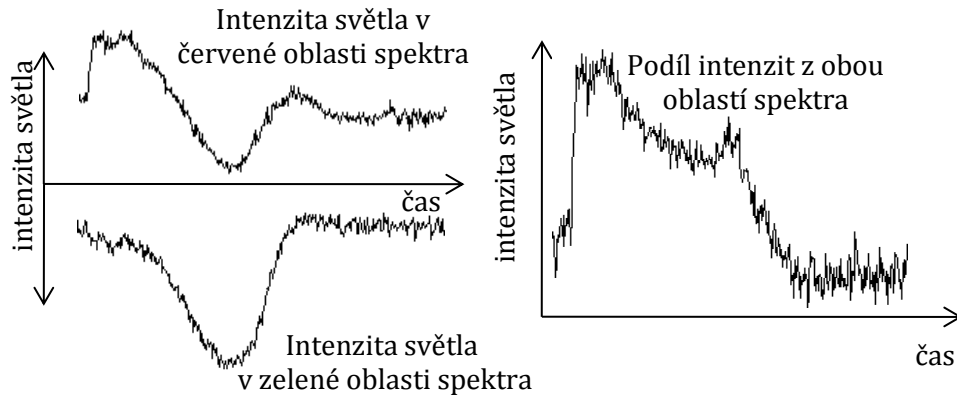
Obrázek 6.2: Vlevo – vzájemně opačné průběhy akčního napětí v červené a zelené oblasti spektra, vpravo – podíl obou průběhů z levé části obrázku. Situace odpovídá záznamu akčního napětí bez pohybového artefaktu.

Vliv PA se projevuje v obou signálech shodně. Při přiblížení obarveného srdce k fotodetektoru vzroste intenzita zaznamenávaného světla. Záznam je tak modulován v obou snímaných spektrech se stejnou velikostí i se stejným znaménkem. Změny intenzity snímaného emisního světla způsobené pohybem srdce a kontrakcí srdeční tkáně nejsou totiž způsobené spektrálním posuvem VSD, ale pouze změnou pozice VSD molekul vůči fotodetektoru. Proto PA způsobuje nárůst a pokles intenzity světla v obou snímaných spektrech shodně. Vliv PA na záznamy AN zobrazuje obrázek (Obrázek 6.3).



Obrázek 6.3: Vlevo – vzájemně opačné průběhy akčního napětí v červené a zelené oblasti spektra, vpravo – podíl obou průběhů z levé části obrázku. Situace odpovídá záznamu akčního napětí s pohybovým artefaktem.

Poměrem signálů je nežádoucí vliv PA odstraněn, a výsledný signál odpovídá pouze elektrické aktivitě srdce [72], jak zobrazuje obrázek (Obrázek 6.3, vpravo). Průběh zaznamenaných dat a výsledek aplikace poměrové metody na tato reálná data je zobrazen na obrázku (Obrázek 6.4). Obrázek zobrazuje sekundový záznam srdeční aktivity.



Obrázek 6.4: Průběh reálně zaznamenaných optických signálů (vlevo) a výsledek poměrové metody (vpravo).

Matematický popis poměrové metody vychází z matematického popisu PA představeného v kapitole 4.2 a je převzat z [51]. Kombinací vztahů 4.1 až 4.4 lze vyjádřit signál registrovaný segmentem fotodiody jako [51]:

$$I_{ds}(t) = I_{es}(t)\{C_s[1 + c_s N(t)][1 + d_s P(t)]F_s(t) + A_s\} \\ = C_s I_{es}(t)F_s(t)[1 + c_s N(t)][1 + d_s P(t)] + A_s I_{es}(t). \quad 6.1$$

kde $I_{ds}(t)$ je intenzita detekovaného světla, $I_{es}(t)$ je intenzita excitačního zdroje, C_s , c_s a d_s jsou kontanty závislé na vlnové délce, $N(t)$ je membránové napětí, $P(t)$ je mechanická aktivita srdce, $F_s(t)$ popisuje vliv fotovysvícení a A_s je intenzita z pozadí měřené scény. Index s nabývá hodnot $s = < 1, 2 >$ a koresponduje s použitým segmentem fotodiody.

Dále je možné zanedbat poslední člen rovnice (6.1), tj. složku $A_s I_{es}(t)$ vyjadřující intenzitu záření pozadí. Tato složka je během záznamu optického signálu automaticky odstraněna, neboť signály jsou zesilovány střídavými zesilovači, které stejnosměrnou složku potlačují. Rovnice (6.1) pak přechází v tvar:

$$I_{ds}^*(t) = C_s I_{es}(t)F_s(t)[1 + c_s N(t)][1 + d_s P(t)]. \quad 6.2$$

kde $I_{ds}^*(t)$ je intenzita detekovaného světla po zanedbání intenzity záření pozadí, C_s , c_s a d_s jsou na vlnové délce závislé kontanty, $I_{es}(t)$ je intenzita excitačního zdroje, $N(t)$ je membránové napětí, $P(t)$ je mechanická aktivita srdce, a $F_s(t)$ popisuje vliv fotovysvícení.

Při současném záznamu světla dvěma segmenty fotodiody je možné vyjádřit poměr mezi dvěma optickými signály zaznamenanými v odlišných spektrálních oblastech:

$$I_{d,poměr}^*(t) = \frac{I_{d1}^*(t)}{I_{d2}^*(t)} = \frac{C_1 I_{e1}(t) F_1(t) [1 + c_1 N(t)] [1 + d_1 P(t)]}{C_2 I_{e2}(t) F_2(t) [1 + c_2 N(t)] [1 + d_2 P(t)]} \quad 6.3$$

kde $I_{d,poměr}^*(t)$ je poměr mezi dvěma optickými signály registrovanými v odlišných spektrálních oblastech, v této práci v oblasti červeného a zeleného světla, $I_{d1}^*(t)$ a $I_{d2}^*(t)$ jsou intenzity detekovaného světla po zanedbání intenzity záření pozadí, C_1 , C_2 , c_1 , c_2 , d_1 a d_2 jsou na vlnové délce závislé kontanty, $I_{e1}(t)$ a $I_{e2}(t)$ jsou intenzity excitačního zdroje, $N(t)$ je membránové napětí, $P(t)$ je mechanická aktivita srdce, a $F_1(t)$ a $F_2(t)$ popisuje vliv fotovysvícení.

Rozšířením poměru $I_{d-poměr}^*(t)$ s následným využitím aproximace Taylorovou řadou může být vztah (6.3) upraven na [51]:

$$I_{d-poměr}^*(t) \sim \frac{H_1(t)}{H_2(t)} [1 + (c_1 - c_2)N(t)] [1 + (d_1 - d_2)P(t)] \quad 6.4$$

kde $H_s(t) = C_s I_{es}(t) F_s(t)$ s indexem s nabývajícím hodnot $s = < 1, 2 >$.

Protože intenzita excitačního světla $I_{es}(t)$ je pro oba segmenty fotodiody stejná, lze při předpokladu přibližně stejného vlivu fotovysvícení $F_1(t) \cong F_2(t)$ a zachování tvaru emisního spektra při spektrálním posuvu $C_1 \cong C_2$ očekávat, že $H_1(t) \cong H_2(t)$, a vztah (6.4) přepsat na [51]:

$$I_{d-poměr}^*(t) \sim [1 + (c_1 - c_2)N(t)] [1 + (d_1 - d_2)P(t)]. \quad 6.5$$

kde c_1 , c_2 , d_1 a d_2 jsou na vlnové délce závislé kontanty, $N(t)$ je membránové napětí a $P(t)$ je mechanická aktivita srdce.

Vzhledem k tomu, že pohyb moduluje světlo v obou snímaných signálech stejně, je rozdíl $d_1 - d_2$ roven nule a vliv pohybu $P(t)$ z rovnice 6.5 vymizí:

$$I_{d-poměr}^*(t) \sim [1 + (c_1 - c_2)N(t)]. \quad 6.6$$

kde $I_{d-poměr}^*(t)$ je signál získaný poměrovou metodou, c_1 a c_2 jsou kontanty, a $N(t)$ vyjadřuje v čase proměnlivé AN. Signál získaný poměrovou metodou tak vyjadřuje závislost optického signálu na membránovém napětí bez přítomnosti rušivých složek způsobených pohybem srdce.

6.2 Výhody poměrové metody

Poměrová metoda má teoretický potenciál v případě malého pohybu zcela potlačit projev PA v záznamech AN. Kromě snadné teoretické prokazatelnosti odstranění PA také velmi dobře funguje v praxi. Poměrová metoda je technikou zpracování signálu, a její použití nezasahuje do samotného procesu záznamu AN. Z hlediska ovlivnění

elektrofyzologie je jedinou metodou použitelnou pro experimentální výzkum, která umožňuje odstranění PA bez nutnosti zasahovat do fyziologie či anatomie zkoumaného modelu. Poměrová metoda dále potlačuje vliv nehomogenity koncentrace barviva v měřené tkáni, vliv nehomogenní internalizace barviva na vnitřních stranách membrán, odstraňuje nežádoucí projev fotovysvícení, a umožňuje eliminovat možné změny v intenzitě excitačního světla, způsobené kolísáním světelného toku excitačního světla [50]. Poměrová metoda se obvykle používá pro zpracování již uložených dat, tedy až po proběhlém experimentu. Svým principem však umožňuje omezení PA i v reálném čase, pokud její algoritmická realizace není výpočetně příliš náročná a nezatěžuje měřicí systém.

6.3 Nevýhody poměrové metody

Na druhou stranu poměrová metoda funguje dobře jen v případech, kdy není PA příliš velký [73], [51]. Přestože poměrová metoda sama o sobě potlačuje AP v záznamech AN, doporučuje se kombinovat s dalšími metodami pro omezení pohybu srdce, jako je endokardiální prochlazení srdce nebo použití mechanických stabilizátorů [50]. Kompletní odstranění PA je možné jen za předpokladu, že je absolutní hodnota emisní intenzity v obou snímaných pásmech světelného spektra stejná [65]. Takový případ však není příliš častý [74]. Navíc je nutné, aby se snímaná spektra vzájemně nepřekrývala, což v praxi běžně používaná VSD nesplňují. Poměrovou metodu lze využít pouze v případě, že odezva barviva na AN způsobí posun spektra, nikoliv změnu jeho amplitudy [70]. To však pro di-4-ANEPPS nepředstavuje limitaci metody [28].

Poměrovou metodu podrobněji zkoumali Knisley [50], Himel [72], a Brown [65], kteří kvantifikovali její úspěšnost. Dospěli k závěru, že signál získaný poměrovou metodou sledoval průběh AN věrněji než původní signály, ale že potlačení PA není úplné. Později analyzoval poměrovou metodu Tai s kolektivem [51], který matematicky zdůvodnil nemožnost odstranění podstatně velkého PA v případě, že vliv pohybu není ve všech detektorech snímaných spektrech stejný, a navrhl její modifikaci. Tato modifikace však vyžaduje volbu správného váhovacího faktoru, jenž lze určit pouze experimentálně [70]. Nutnost experimentální volby váhovacího faktoru znemožňuje srovnání výsledků více záznamů mezi sebou, což využití modifikace limituje a proto není pro účely potlačení PA v této práci použitá. Jako alternativní metoda odstranění PA je v této práci použita ICA.

7 METODA NEZÁVISLÝCH KOMPONENT (ICA)

ICA slouží obecně k oddělení neznámých složek signálu – v terminologii ICA tzv. komponent – v případě, že tyto komponenty byly neznámým způsobem smíseny. ICA patří do skupiny metod pro slepou separaci signálů.

7.1 Terminologie ICA

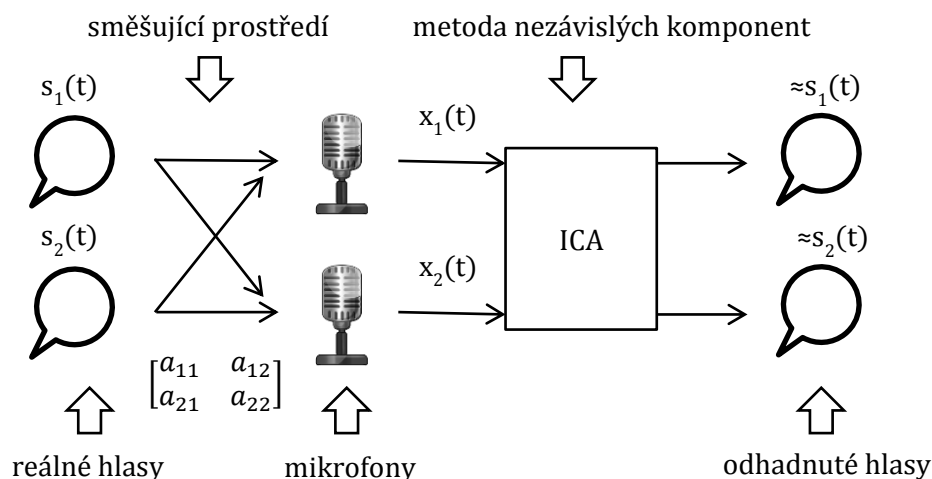
Původně byla ICA navržena pro separaci řečových signálů. Matematicky lze smísení dvou řečových signálů popsat soustavou dvou rovnic:

$$\begin{aligned}x_1(t) &= a_{11}s_1 + a_{12}s_2 \\x_2(t) &= a_{21}s_1 + a_{22}s_2\end{aligned}\tag{7.1}$$

kde $x_1(t)$ a $x_2(t)$ jsou časové průběhy zaznamenaných signálů, a_{11} , a_{21} , a_{12} , a_{22} představují útlum jednotlivých komponent vlivem prostředí a $s_1(t)$ a $s_2(t)$ jsou časové průběhy komponent. Komponentami jsou v ICA terminologii nazývány jednotlivé složky zaznamenaného signálu.

Proces snímání a opětovné separace záznamů hlasů dvou řečníků je naznačen na obrázku (Obrázek 7.1). Zleva doprava jsou nejprve zakresleny bubliny znázorňující reálné hlasy $s_1(t)$ a $s_2(t)$, které se šíří směřujícím prostředím a následně jsou snímány dvěma mikrofony. Zaznamenané signály $x_1(t)$ a $x_2(t)$ z mikrofónů jsou vstupními veličinami ICA. Metoda ICA odhadne na základě pravděpodobnostních charakteristik zaznamenaných signálů takzvané odhadnuté hlasy $s'_1(t)$ a $s'_2(t)$, které tvoří výstup metody. V případě úspěšného odhadu jsou odhadnuté hlasy stejné jako reálné hlasy řečníků. Obrázek (Obrázek 7.1) má pouze ilustrační charakter, v praxi reálné hlasy nejsou pozorovateli dopředu k dispozici, a opravdové využití ICA metody ilustruje jen pravá část obrázku (Obrázek 7.1).

Uvedený příklad dvou separovaných komponent lze rozšířit na libovolný počet komponent, jenž mají být ze zaznamenaných signálů separovány, a řečové signály lze nahradit obecnými signály.



Obrázek 7.1: Proces smísení a opětovné separace záznamů hlasů dvou řečníků.

7.2 Model ICA

ICA pracuje s modelem popisujícím předpokládaný vznik naměřených signálů. V tomto modelu jsou data, která má ICA k dispozici, tvořená lineární nebo nelineární směsí skrytých proměnných, o nichž se předpokládá, že jsou vzájemně statisticky nezávislé. Dále se pro zjednodušení předpokládá, že neznámá mixážní matice, popisující způsob smísení komponent, je čtvercová. Tato podmínka může být v některých variantách ICA vypuštěna, v této práci se jí však není třeba zabývat, protože měřené signály ji splňují.

Matematicky je model ICA definován jako model pracující se skrytými proměnnými, kterými jsou parametry prostředí a komponenty:

$$x_i = a_{i1}s_1 + a_{i2}s_2 + \dots + a_{in}s_n, \text{ pro všechna } i = 1, \dots, n \quad 7.2$$

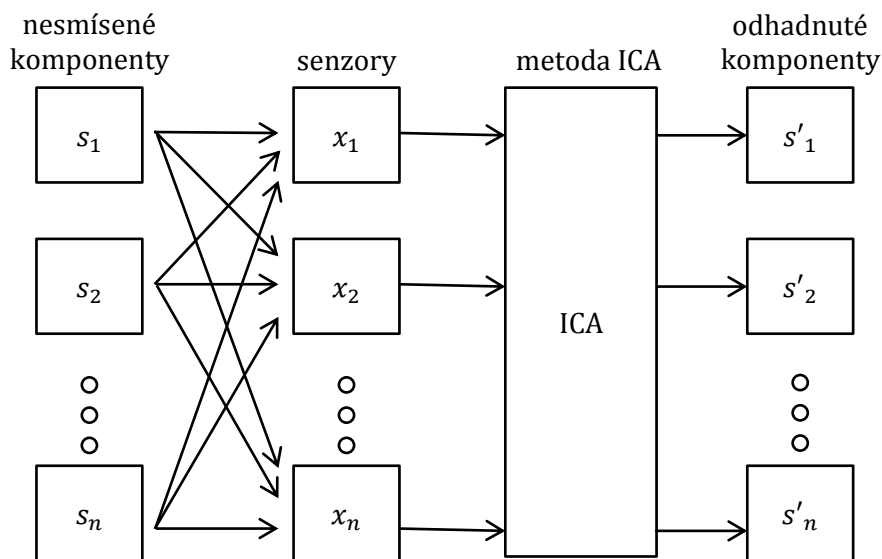
kde $x_i = x_1, x_2, \dots, x_n$ jsou lineární kombinace n náhodných proměnných s_1, s_2, \dots, s_n a a_{ij} pro $i, j = 1, \dots, n$ jsou reálné koeficienty vyjadřující parametry prostředí. Model je zakreslen na obrázku (Obrázek 7.2).

Pro zjednodušení matematického zápisu je možné obecný model ICA zapsat vektorově, a dále je možné jej doplnit o matici n popisující vliv šumu:

$$\mathbf{x} = \mathbf{A}\mathbf{s} + \mathbf{n} \quad 7.3$$

kde \mathbf{x} představuje náhodný vektor s prvky x_1, x_2, \dots, x_n a \mathbf{s} představuje náhodný vektor s prvky s_1, s_2, \dots, s_n . Matice \mathbf{A} označuje mixážní matici s prvky a_{ij} , \mathbf{n} reprezentuje vliv šumu.

Modifikací obecného modelu ICA je model beroucí v úvahu časovou souslednost vzorků signálů. Od obecného modelu se liší tím, že nepovažuje signály \mathbf{x} a komponenty \mathbf{s} za náhodné proměnné, ale za průběhy signálů v čase.



Obrázek 7.2: Obecný model ICA.

Model je proto doplněn o závislost proměnných na čase t a je vyjádřen rovnicí:

$$x_i(t) = a_{i1}s_1(t) + a_{i2}s_2(t) + \dots + a_{in}s_n(t), \text{ pro všechny } i. \quad 7.4$$

kde $x_i(t)$ reprezentuje zaznamenané signály, a_{i1} prvky mixážní matice, a $s_1(t)$ až $s_n(t)$ komponenty signálu. Index i vyjadřuje pořadí komponent, a index t vzorek signálu v čase.

7.3 Cíl ICA

Cílem ICA je odhadnout separační (demixážní) matici \mathbf{A}^{-1} , která je inverzí mixážní matice \mathbf{A} . Je-li tato separační matice odhadnuta, pak lze následně získat odhady komponent \mathbf{s}' prostým vynásobením signálu \mathbf{x} separační maticí \mathbf{A}^{-1} :

$$\mathbf{s}' = \mathbf{A}^{-1}\mathbf{x} \quad 7.5$$

kde \mathbf{s}' představuje vektor odhadnutých komponent s'_1, s'_2, \dots, s'_n , \mathbf{x} představuje vektor zaznamenaných signálů x_1, x_2, \dots, x_n , a \mathbf{A}^{-1} označuje separační matici. V případě správně provedené ICA jsou odhadnuté komponenty \mathbf{s}' tvarově shodné s původními komponentami \mathbf{s} . Odhad separační matice \mathbf{A}^{-1} musí být proveden s co možná nejmenším počtem předpokladů, aby byl co nejvíce obecný.

Odhad prvků separační matice \mathbf{A}^{-1} probíhá iterativně. Po každém novém odhadu je změřena míra vzájemné statistické nezávislosti nově odhadnutých komponent. Postup je opakován až do nalezení maxima vzájemné statistické nezávislosti odhadovaných komponent. Vzájemnou statistickou nezávislost vyjadřuje účelová funkce ICA, takže hledání maxima nezávislosti je hledáním globálního extrému této účelové funkce.

7.4 Podmínky použití ICA

Použití ICA pro separaci komponent je korektní pouze za předpokladu dodržení dvou podmínek:

- Počet záznamů signálu musí být rovný nebo větší počtu komponent.
- Separované komponenty musí být vzájemně statisticky nezávislé. Tato podmínka se odráží v samotném názvu metody: analýza nezávislých komponent.

Statistická nezávislost označuje takový vzájemný vztah komponent, u kterého nemůže být na základě pozorování jedné komponenty odhadnut průběh druhé z nich. Matematicky je statistická nezávislost dvou komponent x a y definována pomocí hustot rozdělení pravděpodobnosti [75]:

$$p_{x,y}(x, y) = p_x(x)p_y(y). \quad 7.6$$

kde $p_{x,y}(x, y)$ je sdružená hustota pravděpodobnosti veličin x a y , a $p_x(x)$ a $p_y(y)$ jsou marginální hustoty těchto veličin.

Marginální hustoty lze vyjádřit ze sdružené hustoty pravděpodobnosti podle vztahů [75]:

$$p_x(x) = \int_{-\infty}^{\infty} p_{x,y}(x, y) dy \quad 7.7$$

$$p_y(y) = \int_{-\infty}^{\infty} p_{x,y}(x, y) dx \quad 7.8$$

kde $p_x(x)$ a $p_y(y)$ jsou marginální hustoty veličin x a y , a $p_{x,y}(x, y)$ je sdružená hustota pravděpodobnosti veličiny x a y . Statistickou nezávislost náhodných proměnných lze tedy dokázat pomocí marginálních hustot rozdělení pravděpodobnosti a sdružené hustoty pravděpodobnosti.

8 VARIANTY ICA

ICA ve skutečnosti nepředstavuje jedinou metodu, ale skupinu metod. ICA je poměrně nová metoda; ačkoliv první zmínka pochází z roku 1980, první úspěšné algoritmy byly vyvinuty až v druhé polovině devadesátých let [75]. Každým rokem přibývají do množiny jejích variant nové způsoby kvantifikace vzájemné statistické nezávislosti odhadovaných komponent. Varianty ICA jsou mnohdy inovovány či modifikovány s cílem umožnit danou variantu použít s méně omezujícími podmínkami. Zcela nové varianty ICA pak vznikají sloučením více původních variant.

Všechny varianty ICA jsou si podobné v tom, že separaci komponent zakládají na

hledání globálního extrému kritéria vyjadřujícího vzájemnou závislost odhadovaných komponent. Jednotlivé varianty se však vzájemně liší ve formulaci tohoto kritéria. Jednotlivá kritéria jsou nesterjné citlivá k charakteristikám zpracovávaného signálu a to se odráží v míře úspěšnosti separace. Díky tomu je možné vybrat variantu ICA, jenž je pro separaci AN a PA z optických záznamů $R(t)$ a $G(t)$ nejvhodnější z hlediska vlastností účelové funkce, determinující korektnost, konzistenci a robustnost separace.

Varianty ICA se dají rozdělit na dvě základní skupiny:

- Modely ICA pracující se signály jako s náhodnými veličinami
- Modely ICA využívající časovou strukturu signálu.

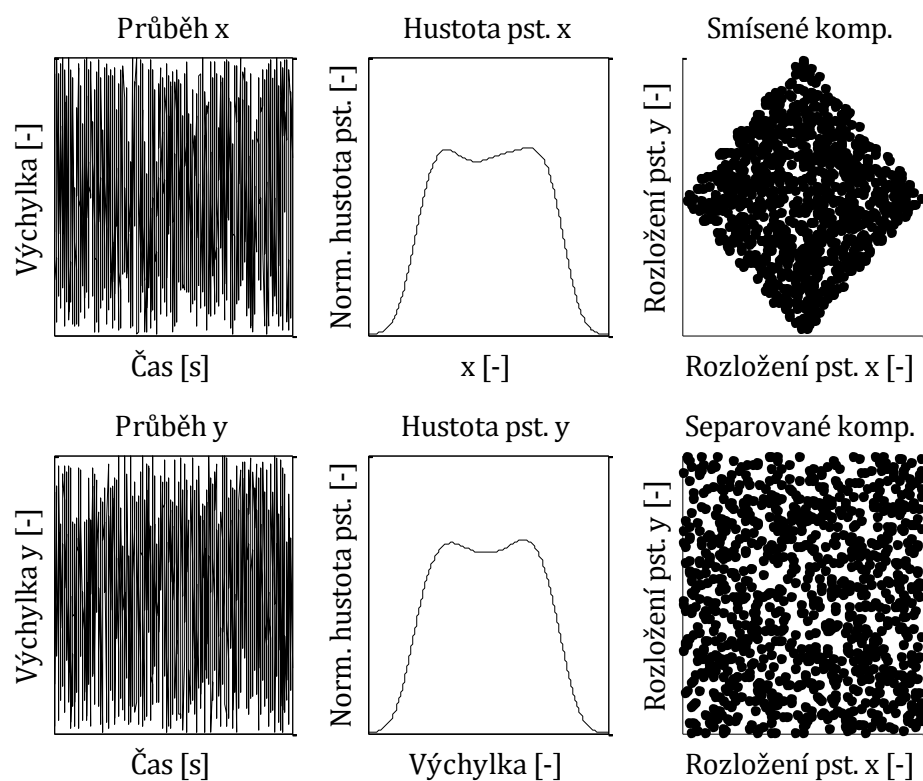
Způsob separace komponent se liší v závislosti na použitém modelu ICA.

8.1 ICA pracující se signály jako s náhodnými veličinami

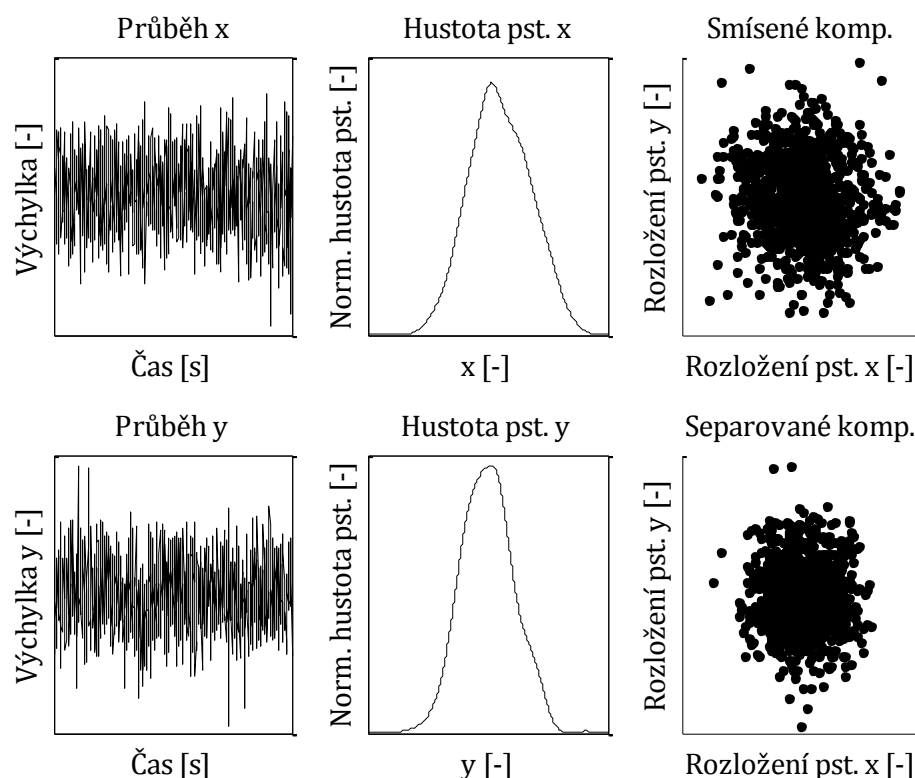
Vývojově starší modely ICA pracují se signály jako s náhodnými veličinami. Tyto modely vychází z předpokladu, že komponenty jsou tvořeny náhodnými veličinami a jednotlivé vzorky signálů mezi sebou nemají žádnou vzájemnou vazbu. Separace komponent vychází z analýzy pravděpodobnostních funkcí těchto signálů. Tímto způsobem fungují varianty ICA využívající maximalizaci negaussovitosti [75], [76], minimalizaci vzájemné informace [75], měření odhadu věrohodnosti [75], měření kumulantů [75], [76], a některé další.

Princip ICA pracující s komponentami jako s náhodnými veličinami lze srozumitelně graficky znázornit s využitím zobrazení pravděpodobnostního rozložení zpracovávaného signálu. V levé části obrázku (Obrázek 8.1) jsou vykresleny dva průběhy náhodné veličiny s rovnoměrným rozložením, představující komponenty k_1 a k_2 . V prostřední části obrázku (Obrázek 8.1) jsou vykresleny jejich odhadnuté pravděpodobnostní charakteristiky. V pravé části obrázku (Obrázek 8.1) jsou zobrazeny korelační diagramy obou komponent. Korelační diagram vpravo nahoře zobrazuje smíšené komponenty, korelační diagram vpravo dole zobrazuje separované komponenty. Oba diagramy se od sebe liší natočením diagramu ve vztahu k souřadnému systému. Míra natočení korelačního diagramu na obrázku určuje míru vzájemné závislosti komponent k_1 a k_2 . ICA funguje tak, že iterativně násobí prvky odhadované separační matice se signály. To způsobuje postupné otáčení korelačních diagramů v pravé části obrázku (Obrázek 8.1), a komponenty se tak stávají více a více vzájemně nezávislé. ICA algoritmus skončí v okamžiku nalezení maxima nezávislosti signálů. Tento okamžik ilustruje dolní pravá část obrázku, ve které je korelační diagram zarovnán se souřadným systémem. Zobrazené signály jsou vzájemně nezávislé, protože znalost hodnoty na horizontální ose korelačního diagramu neumožňuje nijak odhadnout hodnotu na vertikální ose.

Stejná situace je vykreslena na obrázku (Obrázek 8.2), ale místo komponent s rovnoměrným rozdělením jsou zobrazeny komponenty s Gaussovým rozložením pravděpodobnosti. Ze srovnání korelačních diagramů plyne, že ICA není schopna signály separovat, neboť neexistují žádné hrany korelogramu, které by mohla iterativně ortogonalizovat. V případě Gaussovských signálů skutečně základní model ICA nedokáže komponenty separovat [75].



Obrázek 8.1: Vlevo - záznamy dvou komponent tvořených náhodnými signály s rovnoměrným rozložením pravděpodobnosti; uprostřed – odhady hustoty pravděpodobnosti pro tyto signály; vpravo - korelační diagramy smíšených a separovaných komponent.



Obrázek 8.2: Vlevo - záznamy dvou komponent tvořených náhodnými signály s Gaussovým rozložením pravděpodobnosti; uprostřed – odhady hustoty pravděpodobnosti pro tyto signály; vpravo - korelační diagramy smíšených a separovaných komponent.

8.2 ICA využívající časovou strukturu signálu

Vývojově novější modely ICA využívají strukturu sousledných vzorků signálu. Jsou-li komponentami průběhy signálu v čase, obsahují obvykle mnohem více struktury než náhodné proměnné. Díky tomu mohou novější varianty ICA použít k odhadu nezávislých komponent nejen vztahy mezi jednotlivými komponentami, ale také vztahy mezi vzájemně posunutými komponentami.

Varianty ICA pracující s časovou strukturou odhadují separační matici na základě informace obsažené v kovarianční matici pozorovaných signálů, nebo v sérii kovariančních matic.

Typickými reprezentanty jsou metody AMUSE [77], využívající dekompozici kovarianční matice signálů, metoda SOBI [78] a její modifikace SOBI-RO [79], SOBI-BPF [76], SONS [80], a WASOBI [81] s modifikací EWASOBI [82], které využívají sdruženou diagonalizaci skupiny kovariančních matic signálů. Dále budou uvedeny podrobně metody AMUSE, SOBI a WASOBI.

8.2.1 Algoritmus AMUSE

Nejjednodušší způsob odhadu separační matice \mathbf{A}^{-1} zajišťuje algoritmus AMUSE [77]. AMUSE je založený na rozkladu vlastních čísel kovarianční matice signálů. Separační matice \mathbf{A}^{-1} je pomocí AMUSE získána následujícím postupem [76], [77]:

- Jsou vyběleny signály $\mathbf{x}(t)$, čímž jsou získány signály $\mathbf{z}(t)$.
- Je vypočtena kovarianční matice časově posunutých vybělených signálů $\mathbf{C}_\tau^z = E\{\mathbf{z}(t)\mathbf{z}(t - \tau)\}$, kde τ označuje vzájemné posunutí signálu. Obvykle se volí $\tau = 1$.
- Je proveden rozklad matice $\mathbf{C}_\tau^z = \frac{1}{2}[\mathbf{C}_\tau^z + \mathbf{C}_\tau^{zT}]$ na vlastní čísla.
- Vlastní vektory matice \mathbf{C}_τ^z udávají řádky separační matice \mathbf{A}^{-1} .

AMUSE využívá toho, že separační matice je přímo výsledkem rozkladu časově posunuté kovarianční matice bělených signálů na její vlastní čísla [77], [76], [83], [84], [85], [86].

Kovarianční matici:

$$\mathbf{C}_\tau^z = E\{\mathbf{z}(t)\mathbf{z}(t - 1)^T\}, \quad 8.1$$

kde \mathbf{C}_τ^z je kovarianční matice bělených signálů a $\mathbf{z}(t)$ je bělený signál, lze kvůli symetrii přepsat na tvar:

$$\mathbf{C}_\tau^z = \frac{1}{2}[\mathbf{C}_\tau^z + (\mathbf{C}_\tau^z)^T] \quad 8.2$$

a dále rozepsat na:

$$\begin{aligned} \mathbf{C}_\tau^z &= \frac{1}{2}\mathbf{A}^{-1T}E\{\mathbf{s}(t)\mathbf{s}(t - 1)^T + E\{\mathbf{s}(t - 1)\mathbf{s}(t)^T\}\}\mathbf{A}^{-1} \\ &= \mathbf{A}^{-1T}\mathbf{C}_\tau^s\mathbf{A}^{-1}, \end{aligned} \quad 8.3$$

kde \mathbf{C}_τ^z je kovarianční matice bělených signálů, $\mathbf{s}(t)$ je vektor komponent a \mathbf{C}_τ^s na pravé straně rovnice je kovarianční matice komponent. Díky vzájemné nezávislosti obou komponent by měla být matice $\mathbf{C}_\tau^s = E\{\mathbf{s}(t)\mathbf{s}(t - 1)^T\}$ diagonální. Pro zdůraznění diagonality je \mathbf{C}_τ^s přepsána na \mathbf{D} .

Kovarianční matice \mathbf{C}_τ^z tak nabývá formy:

$$\mathbf{C}_\tau^z = \mathbf{A}^{-1T}\mathbf{D}\mathbf{A}^{-1}, \quad 8.4$$

což při srovnání s rovnicí (8.3) ukazuje, že je separační matice \mathbf{A}^{-1} součástí rozkladu vlastních čísel matice, aplikovaného na \mathbf{C}_τ^z . Protože je rozklad vlastních čísel matice numericky snadno spočítatelný pro symetrické matice (to je důvod, proč byla

matice \mathbf{C}_τ^z přepsána na svou symetrickou obdobu), lze pomocí rozkladu vlastních čísel matice jednoduše získat separační matici \mathbf{A}^{-1} . Její řádky jsou přímo tvořené vlastními vektory \mathbf{C}_τ^z .

Poté, co je rozkladem vlastních čísel korelační matice \mathbf{C}_τ^z odhadnuta separační matice \mathbf{A}^{-1} , lze provést podle ICA modelu (rovnice 7.4) odhad komponent. Odhad je proveden vynásobením vektoru $\mathbf{z}(t)$ separační maticí \mathbf{A}^{-1} :

$$\mathbf{A}^{-1}\mathbf{z}(t) = \mathbf{s}(t), \quad 8.5$$

kde $\mathbf{z}(t)$ je vektor signálů a $\mathbf{s}(t)$ vektor komponent.

8.2.2 Algoritmus SOBI

Princip SOBI [78] spočívá v simultánní diagonalizaci početné série korelačních matic časově vzájemně posunutých signálů [78], [87], [88], [89], [90]. Míru posunutí udává parametr τ , nabývající hodnot $\tau = 1, 2, 3 \dots N$. Cílem aproximativní sdružené diagonalizace je nalézt ortogonální matici \mathbf{U} [91], [92], která co nejlépe diagonalizuje sérii matic:

$$\mathbf{M}_i = \mathbf{U}\mathbf{D}_i\mathbf{U}^T + \varepsilon_i, (i = 1, 2, \dots L), \quad 8.6$$

kde \mathbf{M}_i označuje kovarianční matice časově vzájemně posunutých vybělených signálů, \mathbf{D}_i je diagonální a reálná matice, a ε_i představuje náhodné chyby a šum. Symbol L označuje celkový počet kovariančních matic, přičemž pokud je $L > 2$, pak představuje hledání ortogonální matice \mathbf{U} řešení přeureného systému rovnic, a obecně nelze nalézt přesnou diagonalizační matici \mathbf{U} s $\varepsilon_i = 0$ pro všechna i . (Přeurená soustava rovnic je soustava rovnic, která obsahuje více rovnic než neznámých.) Proto je aproximativní sdruženou diagonalizací hledána taková diagonalizační matice, která minimalizuje účelovou funkci

$$J(\mathbf{U}, \mathbf{D}_i) = \sum_{i=1}^L \|\mathbf{M}_i - \mathbf{U}\mathbf{D}_i\mathbf{U}^T\|^2, \quad 8.7$$

kde $J(\mathbf{U}, \mathbf{D}_i)$ je účelová funkce, \mathbf{M}_i označuje kovarianční matice časově vzájemně posunutých vybělených signálů, a \mathbf{U} je hledaná ortogonální matice, a \mathbf{D}_i je diagonální a reálná matice.

Cenová funkce $J(\mathbf{U}, \mathbf{D}_i)$ je však závislá jak na hledané ortogonální matici \mathbf{U} , tak na diagonální matici \mathbf{D}_i . Dvojitá závislost lze vyřešit metodou alternujících nejmenších čtverců, nebo je možné úlohu odhadu ortogonální matice \mathbf{U} převést na úlohu minimalizace účelové funkce [93]:

$$J(\mathbf{U}) = \sum_{i=1}^L \text{off}\{\mathbf{U}^T \mathbf{M}_i \mathbf{U}\}, \quad 8.8$$

kde $J(\mathbf{U})$ je účelová funkce, a kde

$$\text{off}\{\mathbf{M}\} = \sum_{i \neq j} |m_{ij}|^2 \quad 8.9$$

představuje součet nediagonálních prvků kovariančních matic \mathbf{M} . V případě dosažení přesné diagonality by se tento součet měl rovnat nule, v praxi stačí najít jeho minimum.

Hledaná separační matice \mathbf{A}^{-1} je přesně rovna \mathbf{U} v okamžiku nalezení minima účelové funkce (8.8).

8.2.3 Algoritmus WASOBI

WASOBI využívá pro odhad separační matice nelineární váhovanou metodu nejmenších čtverců. Nelineární váhovaná metoda nejmenších čtverců odhaduje neznámou mixážní matici \mathbf{A} a K neznámých diagonálních matic $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_K$ takových, aby jejich kombinace co nejlépe odpovídala sérii známých korelačních matic $\mathbf{R}_x[\tau_k]$:

$$\mathbf{R}_x[\tau_k] \sim \mathbf{A} \lambda_K \mathbf{A}^T, \quad 8.10$$

kde $\mathbf{R}_x[\tau_k]$ je série korelačních matic, \mathbf{A} je odhadovaná mixážní matice, a $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_K$ jsou dosud neznámé diagonální matice.

Prvky matic \mathbf{A} a $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_K$ představují neznámé proměnné, které jsou cílem odhadu a předem nejsou známy. Odhad korelačních matic známý je, neboť lze spočítat z pozorovaných signálů:

$$\mathbf{R}_x[\tau_k] = \frac{1}{T} \sum_{t=1}^T \mathbf{x}[t] \mathbf{x}^T[t + \tau_k], \quad 8.11$$

kde $\mathbf{R}_x[\tau_k]$ je K korelačních matic pozorovaného signálu pro časy $\tau = 1, \dots, k$, T označuje počet vzorků signálu, \mathbf{x} je pozorovaný signál, přičemž počet vzorků signálu musí být alespoň $T + \tau_k$.

Protože odhady korelačních matic $\mathbf{R}_x[\tau_k]$ nemusí být symetrické, na rozdíl od $\mathbf{A} \lambda_K \mathbf{A}^T$, je potřeba je nejprve symetrizovat. Symetrizace je provedena substitucí mimodiagonálních prvků matice jejich aritmetickými průměry. S využitím vektorového zápisu $\mathbf{r}_k = \text{vec}\{\mathbf{R}_x[\tau_k]\}$ lze symetrickou variantu korelační matice vyjádřit jako:

$$\mathbf{y}_k = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,5 & 0,5 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \mathbf{r}_k = C \mathbf{r}_k \text{ pro } k = 1, 2, \dots, K., \quad 8.12$$

kde \mathbf{y}_k je symetrická verze korelační matice \mathbf{r}_k , C je matice provádějící tuto symetrizaci, a K udává počet korelačních matic.

Symetrická varianta korelační matice \mathbf{y}_k by se měla co nejvíce rovnat $\mathbf{A} \boldsymbol{\lambda}_k \mathbf{A}^T$, vyjádřené jako

$$\mathbf{y}_k \sim \begin{bmatrix} a_1^2 & a_3^2 \\ a_1 a_2 & a_3 a_4 \\ a_2^2 & a_4^2 \end{bmatrix} \boldsymbol{\lambda}_k = \mathbf{G}(a) \boldsymbol{\lambda}_k, \quad 8.13$$

kde \mathbf{y}_k je symetrická korelační matice, $\mathbf{G}(a)$ zajišťuje symetričnost matice \mathbf{A} a $\boldsymbol{\lambda}_k$ jsou diagonální matice.

Zřetěžením všech symetrických variant korelačních matic \mathbf{y}_k do jediné matice $\mathbf{y} = [\mathbf{y}_1^T, \mathbf{y}_2^T, \dots, \mathbf{y}_K^T]^T$ a zároveň zřetěžením všech $\boldsymbol{\lambda}_k$ do jediné matice $\boldsymbol{\lambda}$ je získán vztah:

$$\mathbf{y} \sim [\mathbf{I}_K \otimes \mathbf{G}(a)] \boldsymbol{\lambda} = \mathbf{G}'(a) \boldsymbol{\lambda}, \quad 8.14$$

kde \mathbf{I}_K je jednotková matice, $\mathbf{G}(a)$ je symetrizovaná matice \mathbf{A} , symbol \otimes označuje Kroneckerův součin a $\mathbf{G}'(a)$ označuje rozšíření $\mathbf{G}(a)$ vzniklé Kroneckerovým součinem s jednotkovou maticí.

Míru okamžité shody mezi odhadem a skutečností udává váhované minimalizační kritérium. Váhované minimalizační kritérium je dáno rozdílem symetrizovaných korelačních matic \mathbf{y} a odhadnutých prvků $\mathbf{G}'(a) \boldsymbol{\lambda}$ a má tvar:

$$C_{VNC} = [\mathbf{y} - \mathbf{G}'(a) \boldsymbol{\lambda}] \mathbf{W} [\mathbf{y} - \mathbf{G}'(a) \boldsymbol{\lambda}]^T, \quad 8.15$$

kde C_{VNC} je váhované minimalizační kritérium, $\mathbf{G}'(a)$ je rozšířená symetrizovaná matice \mathbf{A} a \mathbf{W} je symetrická váhová matice. Optimální váhovací matice \mathbf{W} , která minimalizuje součet čtverců odchylek odhadovaných parametrů, je dána inverzí kovarianční matice \mathbf{y} [82]:

$$\mathbf{W} = \{\text{cov}[\mathbf{y}]\}^{-1}, \quad 8.16$$

kde \mathbf{W} je symetrická váhovací matice, a \mathbf{y} reprezentuje symetrickou variantu korelační matice signálů.

Kritérium C_{VNC} je algoritmem WASOBI iteračně minimalizováno nelineární Gaussovou metodou [94]. Gaussův iterační algoritmus nabývá tvaru:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{a}^{[l+1]} \\ \boldsymbol{\lambda}^{[l+1]} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{a}^{[l]} \\ \boldsymbol{\lambda}^{[l]} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{H}^T \mathbf{W} \mathbf{H} & \mathbf{H}^T \mathbf{W} \mathbf{G} \\ \mathbf{G}^T \mathbf{W} \mathbf{H} & \mathbf{G}^T \mathbf{W} \mathbf{G} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{H}^T \mathbf{W} \\ \mathbf{G}^T \mathbf{W} \end{bmatrix} [\mathbf{y} - \mathbf{G} \boldsymbol{\lambda}^{[l]}], \quad 8.17$$

kde l označuje počet iterací, \mathbf{a} jsou prvky odhadované mixážní matice, $\boldsymbol{\lambda}$ jsou odhadované diagonální matice, \mathbf{W} je váhovací matice, \mathbf{y} je symetrická varianta korelační matice signálů a kde \mathbf{H} a \mathbf{G} jsou parciální derivace spočítané podle vztahů:

$$\mathbf{H} = \frac{\partial (G(\mathbf{A}) \boldsymbol{\lambda})}{\partial \mathbf{a}}, \quad 8.18$$

$$\mathbf{G} = \frac{\partial (G(\mathbf{A}) \boldsymbol{\lambda})}{\partial \boldsymbol{\lambda}}. \quad 8.19$$

Počáteční odhad $\mathbf{a}^{[0]}$ a $\boldsymbol{\lambda}^{[0]}$ je proveden pomocí SOBI. Iterace skončí nalezením minima kritéria C_{VNC} . Iterační smyčka algoritmu obvykle konverguje velmi rychle [81], [82].

Hledaná separační matice \mathbf{A}^{-1} je rovna inverzi odhadnuté matice \mathbf{A} , poté, je separační matice znova sestrojena z řádkového vektoru \mathbf{a} , obsahujícím její prvky.

9 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem dizertační práce je popsat PA vznikající při optickém záznamu AN, a nalézt metodu umožňující jeho potlačení v těchto záznamech.

Cíle dizertační práce jsou rozděleny do tří oblastí: specifikace záznamového systému pro registraci elektrické aktivity srdce, popis PA, a návrh odstranění PA metodou nezávislých komponent spolu s ověřením správnosti výsledků dosahovaných touto metodou. Jednotlivé oblasti jsou v následujícím přehledu rozvinuty do dílčích cílů dizertační práce.

Specifikace záznamového systému pro registraci elektrické aktivity srdce:

- popis zajištění vitálních funkcí srdce,
- popis záznamu elektrogramu,
- popis záznamu AN.

Popis PA:

- určení jevů způsobujících PA ve vztahu k použitému záznamovému zařízení,
- analýza průběhu PA v záznamu AN,
- analýza intra-individuální a inter-individuální variability průběhu PA.

Návrh a ověření metody pro odstranění PA:

- využití ICA pro odstranění PA,
- ověření podmínek ICA pro modelová i reálná data,
- teoretický a empirický výběr nejvhodnější varianty ICA,
- ověření korektnosti ICA pro modelová data,
- ověření korektnosti ICA srovnáním ICA s poměrovou metodou.

Navrhovaná metoda pro potlačení PA musí navíc zohlednit provedení experimentů, které mohou být zaměřeny např. na studium vlivu opakované ischemie, nebo na studium vlivu farmak na fyziologii srdce. Z toho plynou následující omezení:

- Použitý způsob záznamu optických signálů musí umožňovat dlouhodobé snímání elektrické aktivity srdce. Během záznamu signálů nesmí být žádným způsobem ovlivněna fyziologie měřeného srdce.
- Během záznamu nesmí být využity farmakologické blokátory pohybu. Studie vlivu farmak vylučují použití dalších farmakologických přípravků, které se běžně pro potlačení kontrakce srdce používají [28]. Použití farmakologických blokátorů pro potlačení pohybu izolovaného srdce je zcela vyloučeno z důvodu možných nežádoucích interakcí, ať už chemických či biologických, se studovanými farmaky.
- Během záznamu nesmí být omezen volný pohyb srdce. Izolované srdce laboratorního zvířete nesmí být mechanicky omezeno ve svém pohybu, neboť zpětnovazební mechanismy srdce mohou při kompresi srdeční tkáně nežádoucím způsobem ovlivnit elektrofyzilogii a tím průběh zaznamenaného AN. Z tohoto důvodu není možné použít mechanické blokátory pohybu běžně používané pro potlačení pohybu srdce [28].

10 REGISTRACE ELEKTRICKÉ AKTIVITY SRDCE

Záznamy elektrické aktivity v této práci pochází z brněnské Laboratoře experimentální kardiologie. V této laboratoři jsou prováděny experimenty objasňující základní elektrofyzilogii, studie elektrofyzilogie srdce na buněčné úrovni při výzkumu lokálních či globálních ischemií, a studie změn způsobených intervencí farmakologických látek, testovaných na izolovaných srdcích v procesu klinického testování léčiv. Záznamy pochází z experimentu, během něhož byla sledována fyziologie izolovaného srdce během globální ischemie.

Elektrická aktivita srdce byla kontinuálně zaznamenána z izolovaného zvířecího srdce ve formě elektrogramu a současně z malé skupiny buněk levé komory ve formě optického záznamu AN. Povrchové záznamy elektrické aktivity srdce byly získány z izolovaných srdcí laboratorních potkanů. Použití srdce potkana bylo podmíněno experimentální metodikou i cílem výzkumu. Obecně však platí, že touto prací popisovaný přístup odstranění PA lze použít pro všechny malé živošičné druhy (potkan, morče, králík).

10.1 Perfuze srdce a zajištění jeho vitálních funkcí

Perfuze srdce zajišťuje výživu myokardu a tím zajišťuje vitální funkce srdce. Srdce bylo perfundováno podle Langendorffa [95]. Při perfuzi srdce Langendorffovou metodou byla aorta srdce navléknuta na kanylu. Perfuzát díky uzavřené aortální chlopni neproudil do levé komory, ale přímo do koronárního systému. Směr toku perfuzátu byl opačný než směr toku krve za fyziologických podmínek. Komory tedy zůstávaly prázdné a objem srdce se nezvětšoval tak výrazně, jako u neizolovaného pracujícího srdce. Srdce se pravidelně kontrahovalo, ale charakteristika kontrakce byla pro izolované srdce odlišná od srdce normálně umístěného v těle laboratorního zvířete. Nicméně i v případě izolovaného srdce byl pohyb srdeční stěny relativně velký a při záznamu elektrické aktivity optickou cestou představoval zdroj nežádoucího rušení.

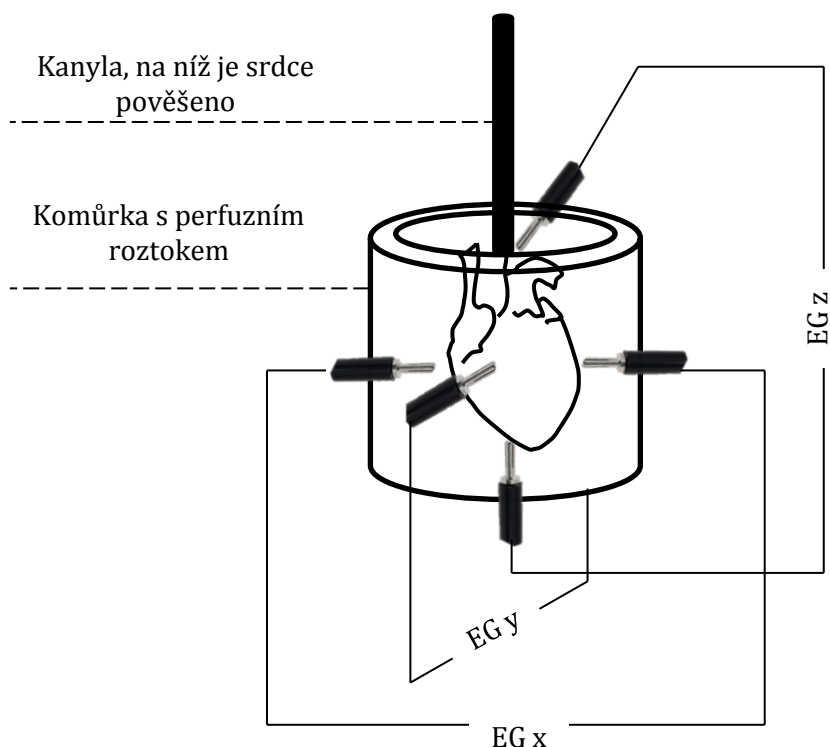
Dlouhodobé snímání elektrické aktivity izolovaného srdce bylo umožněno splněním následujících podmínek:

- Korektní preparace orgánu z těla laboratorního zvířete: laboratorní zvířata byla před preparací srdce anestetizována a uměle ventilována během zákroku [96]. Samotné otevření hrudního koše a vyjmutí srdce trvalo několik sekund, a vzápětí po vyjmutí bylo srdce vloženo do chladného roztoku, jenž svou nízkou teplotou blízkou 0°C zpomalil metabolismus srdce. Správně preparované srdce si zachovalo funkčnost převodního systému i schopnost spontánní kontrakce.
- Vhodná fixace měřeného vzorku: izolované srdce bylo připevněno u své báze k Langendorffově perfuznímu systému, zatímco jeho hrot byl ponechán volně visící. Celé srdce bylo po připevnění vloženo do kádinky s Krebs-Henseleitovým roztokem, který srdce nadnášel a zároveň zamezil osychání srdce. Situaci zobrazuje fotografie na obrázku (Obrázek 10.2). Kontrakce srdečních stěn a jimi vyvolaný pohyb celého srdce nebyly nijak omezeny.

- Perfuze živným roztokem: srdce bylo perfundováno Krebs-Henseleitovým roztokem s konstantním tlakem, který se nastavoval pro každé perfundované srdce zvlášť podle druhu a velikosti laboratorního zvířete. Typická hodnota tlaku je přibližně 85mmHg. Roztok byl přiváděn ze zásobníku do koronárního řečiště srdce, z něž vytékal do kádinky. Krebs-Henseleitův roztok obsahoval také směs plynů tvořenou 95% kyslíkem a 5% oxidem uhličitým. Teplota roztoku byla termostatem udržovaná na 37°C a byla kontrolována jednak v kanyle, kterou procházel perfusát do srdce, a jednak v měřicí komůrce v roztoku, který srdce obklopuje [96]. Tím bylo simulováno vnitřní prostředí laboratorního zvířete.

10.2 Záznam elektrogramu

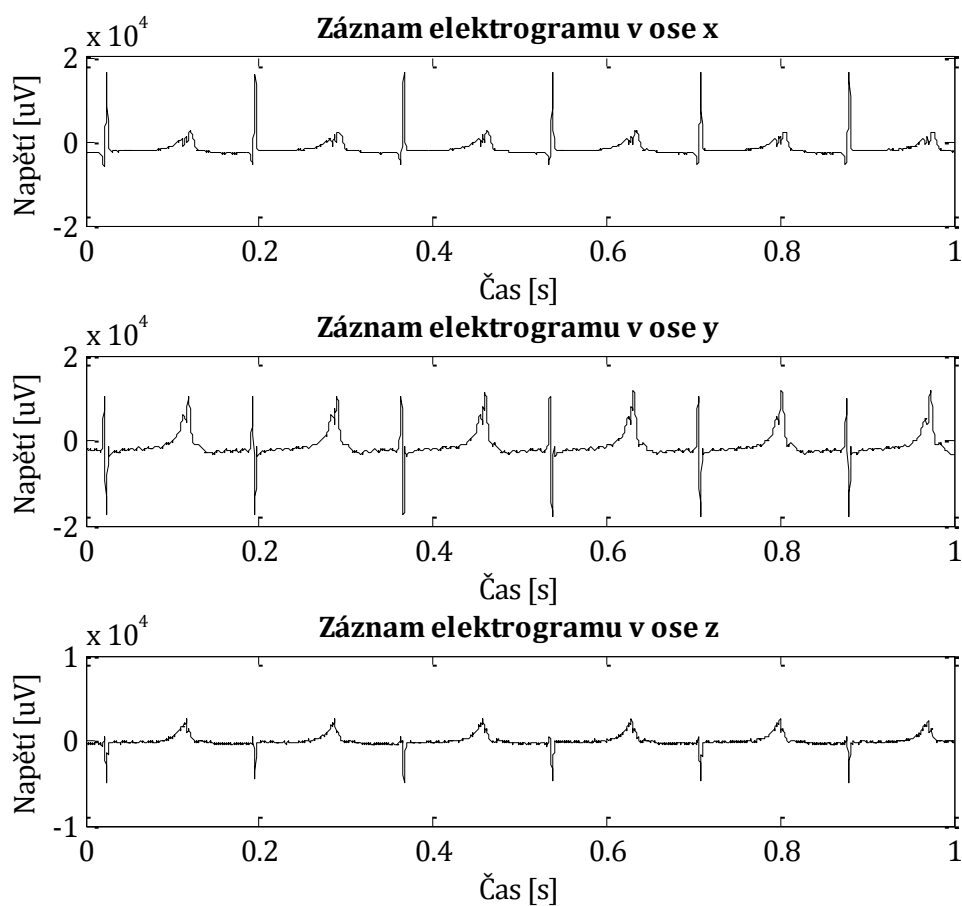
Elektrická aktivita izolovaného srdce byla zaznamenána pomocí tří bezkontaktních elektrodových svodů, umístěných vzájemně ortogonálně. Elektrody byly umístěny v nádobě, v níž bylo srdce ponořeno, a vodivý styk se srdcem zajišťoval živný roztok, který srdce obklopoval. Umístění elektrod vzhledem k srdci zachycuje obrázek (Obrázek 10.1). Krátký úsek zaznamenaných elektrogramů zobrazuje obrázek (Obrázek 10.3).



Obrázek 10.1: Konstrukční řešení svodového systému pro záznam tří elektrogramů (EG).



Obrázek 10.2: Vlevo - vanička s izolovaným srdcem; vpravo - perfusní systém.



Obrázek 10.3: Ukázka tří zaznamenaných vzájemně ortogonálních elektrogramů.

10.3 Záznam akčního napětí

Elektrická aktivita srdečních buněk byla zaznamenána optickou metodou. Záznamový systém navržený Provazníkem a Novákovou [97] a později modifikovaný Kolářovou [98] je zobrazen na obrázku (Obrázek 10.4). Průběh AN byl pomocí uvedeného optického systému zaznamenáván s vzorkovací frekvencí $f_{vz} = 2000\text{Hz}$, a kvantován analogově-digitálním převodníkem s 16-ti bitovým rozlišením. Snímací systém obsahuje zdroj excitačního světla, pracující srdce, na jehož tkáň je navázáno barvivo, a fotodetektor snímající emisní světlo.

10.3.1 Zdroj excitačního světla

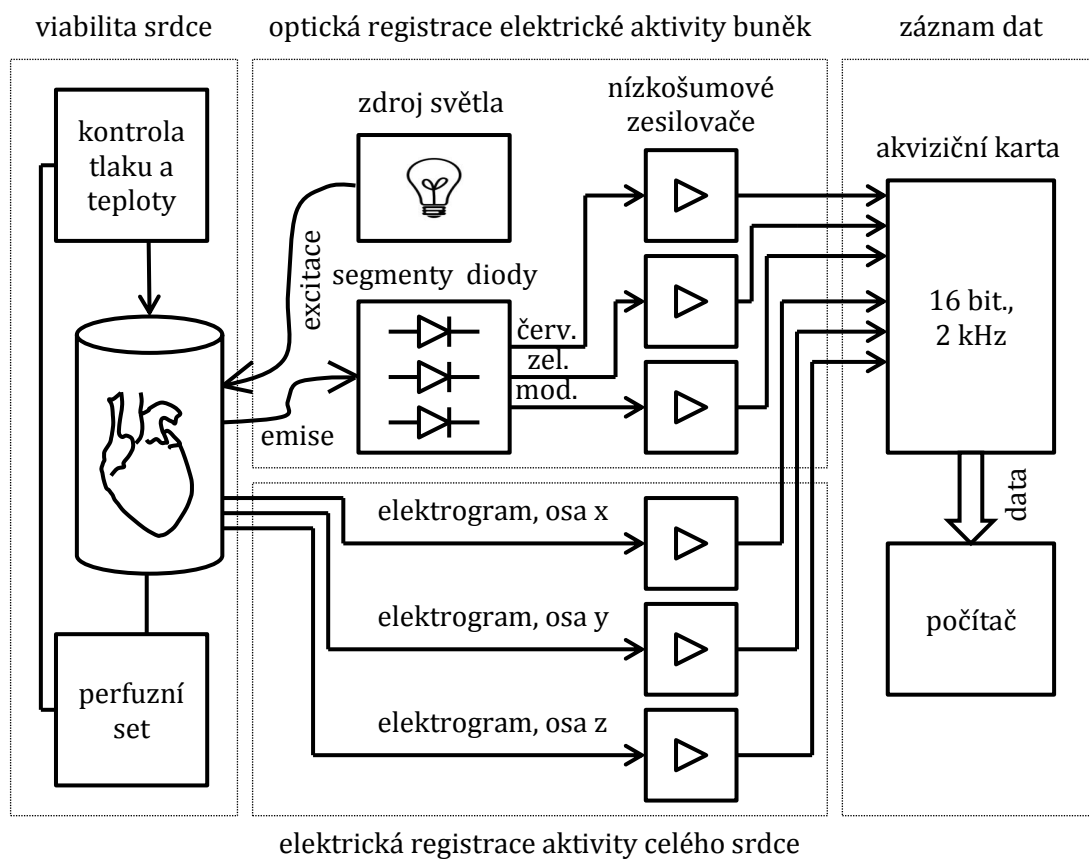
Jako zdroj excitačního záření byla použita halogenová lampa, která generuje světlo v celém rozsahu viditelného spektra. Pomocí předřazeného optického filtru s pásmovou propustí vlnových délek $\lambda = 506 \pm 30\text{nm}$ bylo z viditelného spektra propuštěno pouze světlo v oblasti excitace di-4-ANEPPS ($\lambda = 360 - 550\text{nm}$).

Ze zdroje světla byl světelný paprsek veden k povrchu myokardu optickými vlákny. Použití optických vláken umožnilo definovat konkrétní místo myokardu, které bylo opticky excitováno a z kterého bylo zároveň snímáno emisní světlo. V této studii byla pro vedení světelného paprsku využita flexibilní optická sonda FCR-7IR200-2-ME (Avantes, Netherlands), umožňující jednobodové snímání [37]. Sonda je tvořena sedmi optickými vlákny o průměru $200\mu\text{m}$, s průřezem zobrazeným na obrázku Obrázek 10.5. Každé vlákno může přenášet vlnové délky v rozsahu $\lambda = 350 - 2000\text{nm}$.

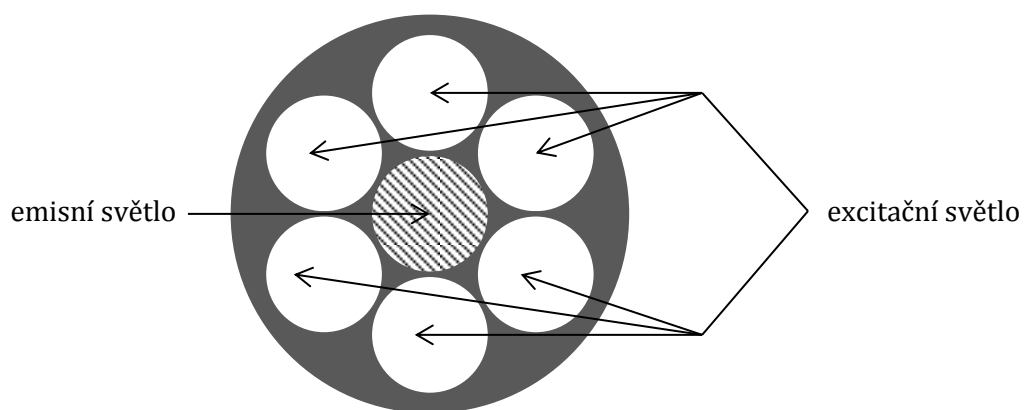
Šest optických vláken obklopujících prostřední vlákno slouží k přenosu excitačního světla ze světelného zdroje, prostřední vlákno slouží k přenosu emisního světla z povrchu myokardu k fotodetektoru. Všechna sedm vláken je chráněno kovovým pláštěm, který mechanicky chrání optická vlákna a zároveň umožňuje elektrické stínění.

Optická sonda byla jedním svým koncem umístěna v těsné blízkosti srdeční stěny, neboť procházela stěnou kádinky, v níž je srdce umístěno. Přesná pozice sondy byla nastavena mikromanipulátorem, který umožňoval sondu směřovat ve třech směrech: horizontálně, vertikálně a proximálně/distálně od myokardu. Tím bylo možné nastavit optimální pozici hrotu sondy vzhledem k místu snímání. Druhý konec sondy byl rozdělen na dva světlovodiče vedoucí ke zdroji excitačního světla a k fotodetektoru.

Pro tuto práci je z hlediska analýzy PA podstatné, že pomocí mikromanipulátoru byla sonda nastavena tak, že se nedotýkala stěny izolovaného srdce, a tím nepřispívala k fixaci měřeného vzorku. Mechanická fixace z pohledu fyziologie není žádoucí, jak bylo vysvětleno v kapitole 5.2.



Obrázek 10.4: Měřicí systém, převzato a upraveno z [37].

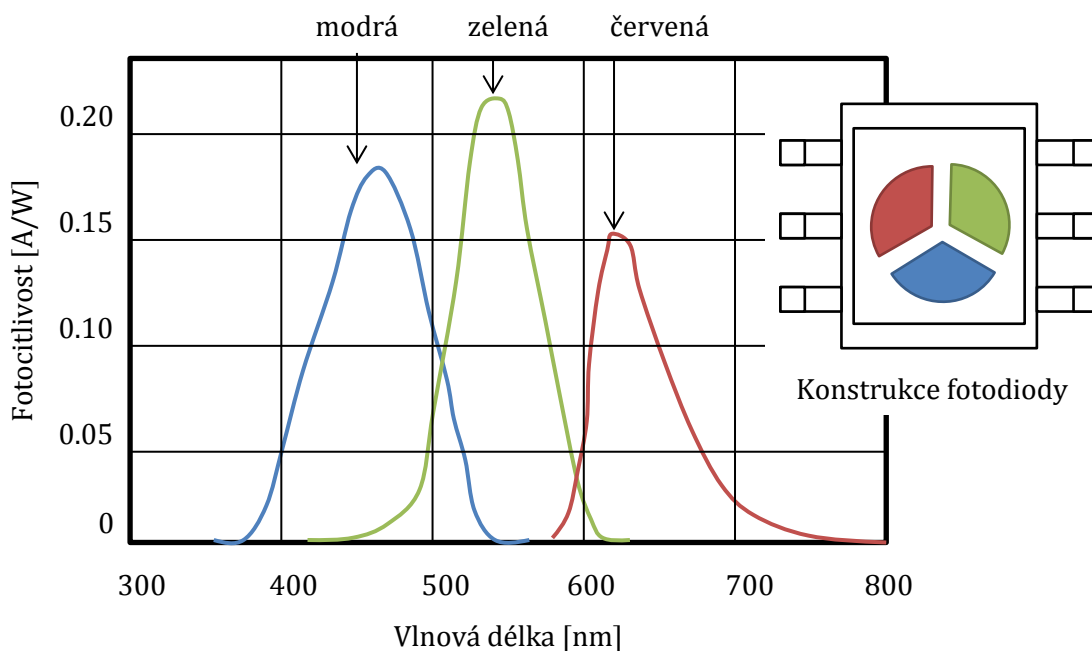


Obrázek 10.5: Průřez optickou sondou FCR-7IR200-2-ME.

10.3.2 Snímání emisního světla

Snímání emisního světla bylo zajištěno opticko-elektrickým převodníkem, na jehož vstupu je trojsegmentová světlocitlivá křemíková fotodiody S9032-02 [99] firmy Hamamatsu.

Trojsegmentová dioda umožňuje záznamenávat optický signál ze stejného místa tkáně současně ve třech různých rozsazích spektra emisního světla. Detekční plocha fotodiody má kruhový průřez rozdělený na tři výseče. Každá výseč snímá světlo v odlišném rozsahu vlnových délek spektra, jak ukazuje obrázek (Obrázek 10.6). Jednotlivé segmenty fotodiody jsou na sobě funkčně nezávislé a na výstupní signály z fotodiody lze nahlížet jako na tři různé optické signály, označené např. modrý, zelený a červený optický signál.



Obrázek 10.6: Spektrální rozsah segmentů fotodiody a geometrické řešení segmentů.

Emisní světlo VSD bylo snímáno segmenty fotodiody v oblasti červeného (590 – 720 nm) a zeleného (480 – 600 nm) světla. Srovnání detekčních spekter diody s fluorescenčními spektry di-4-ANEPPS je zobrazeno na obrázku (Obrázek 10.7). Z obrázku plyne, že oblasti červeného a zeleného spektra se vzájemně mírně překrývají. V ideálním případě by se spektra překrývat neměla, neboť překrytí limituje úplné odstranění PA v zaznamenaných signálech.

Výchyly fotodiodou zaznamenaných signálů odpovídají úměrně okamžité výchylce AN. Okamžitá výchylka AN v zeleném a červeném signálu je opačná, protože výchylka AN je reprezentována spektrálním posuvem emitovaného světla, nikoliv zvýšením celkové intenzity emisního světla. Celková intenzita emitovaného světla zůstává i při změně AN stále stejná, mění se pouze intenzita světla v jednotlivých intervalech spektra, definovaných detekčními oblastmi segmentů fotodiody. Záznamy AN v zelené a červené oblasti spektra jsou zobrazeny na obrázku (Obrázek 10.8).

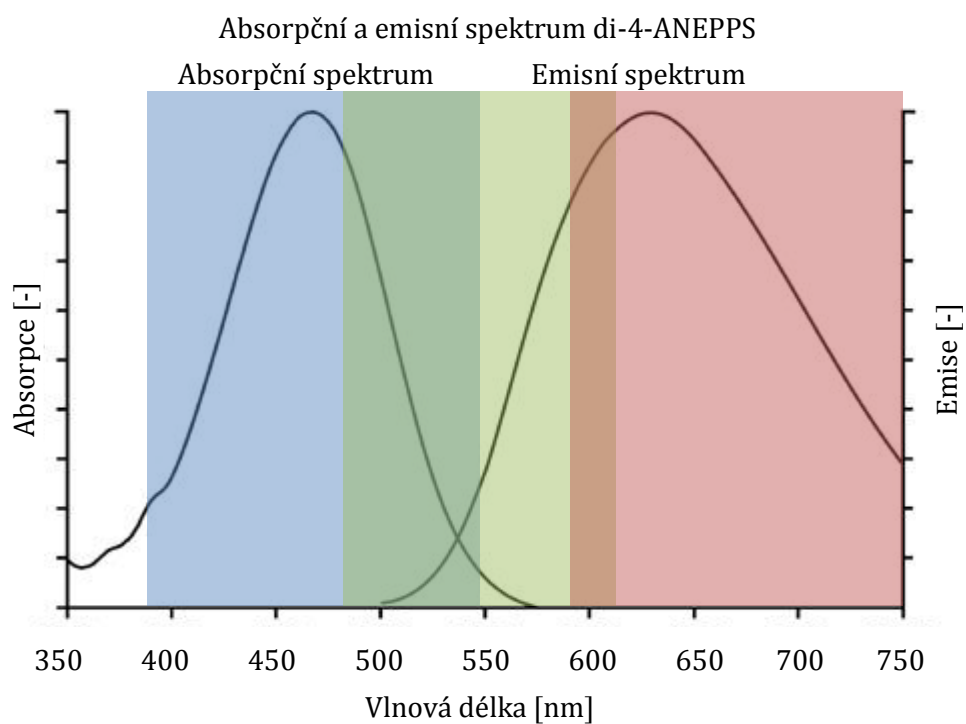
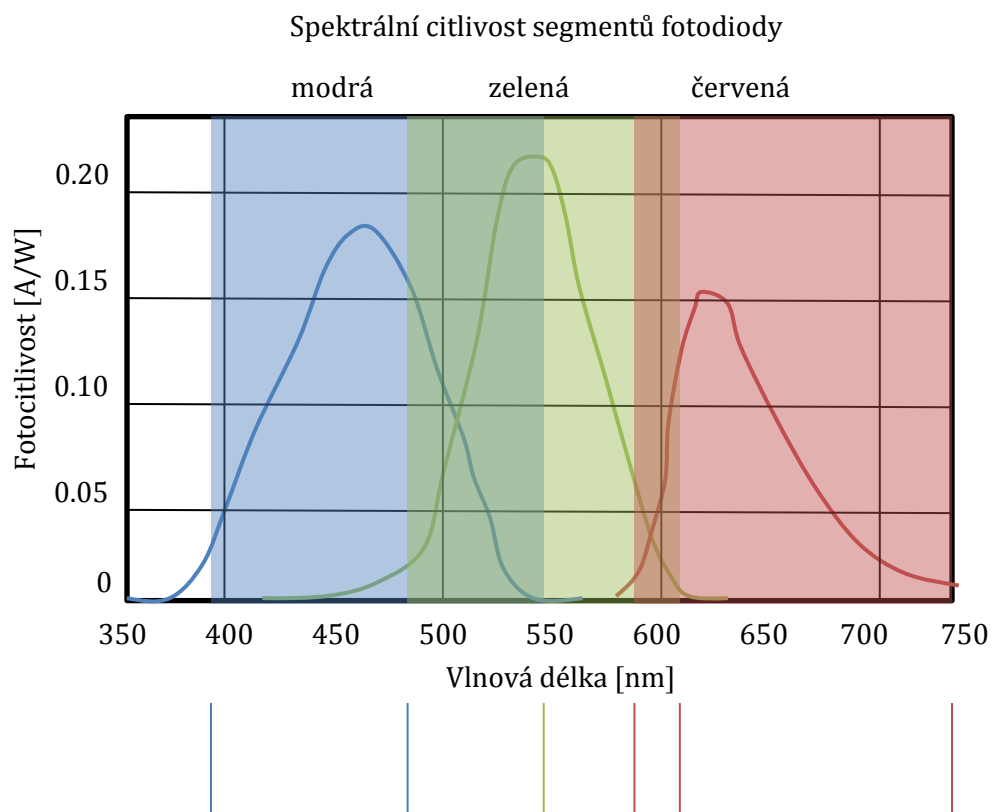
Dále byl pro záznam PA použit segment fotodiody snímající modrou část spektra. Signál úměrný modrému světlu odpovídal odraženému excitačnímu světlu a tudíž reflektoval pohyb srdeční stěny. Záznam pohybu je zobrazen na obrázku (Obrázek 10.8).

10.4 Charakteristika signálů zaznamenaných optickou metodou

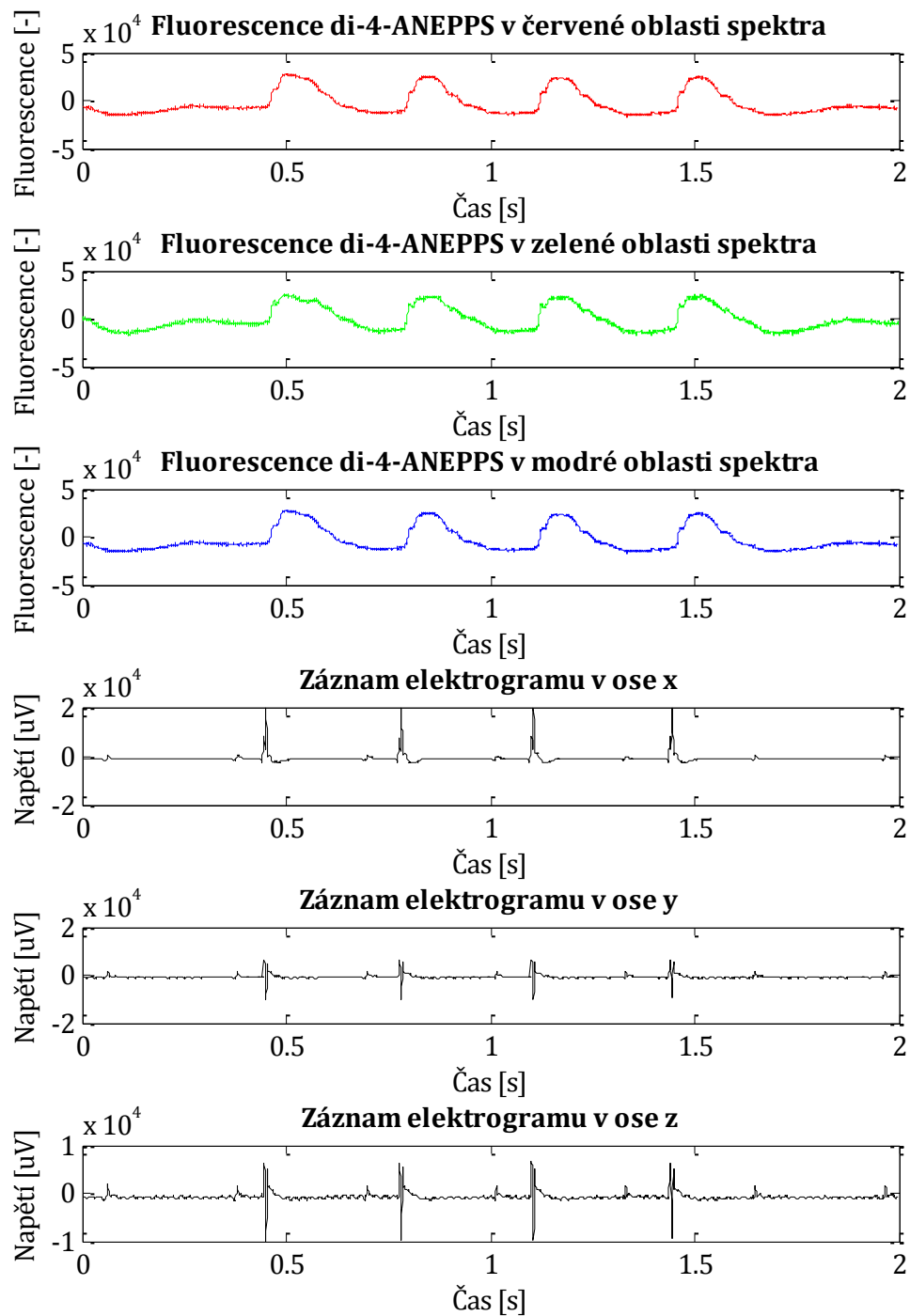
Měření probíhalo dlouhodobě (1,5 - 2 hodiny) s použitím VSD bez dalších farmakologických přípravků pro omezení pohybu. Rovněž samotné použití VSD neovlivňuje fyziologii ani kontrakci izolovaného srdce [100].

Typický reprezentant záznamu elektrické srdeční aktivity je zobrazen na obrázku (Obrázek 10.8). Jedná se o záznam elektrické aktivity potkana.

Optické signály v horní části obrázku (Obrázek 10.8) byly zaznamenány současně s vzájemně ortogonálními elektrogramy v dolní část obrázku (Obrázek 10.8). Obrázek (Obrázek 10.8) ukazuje, že jsou optické signály zarušené šumem a znehodnocené PA, který v zaznamenaných signálech převládá. Vliv pohybu, přítomného během registrace elektrické srdeční aktivity, je v záznamech AN dominantní složkou signálu. Přítomnost PA tak představuje největší problém doprovázející optické snímání.



Obrázek 10.7: Srovnání detekčních spekter diody S9032-02 s fluorescenčními spektry di-4-ANEPPS.



Obrázek 10.8: Záznam optických signálů v červené, zelené a modré oblasti spektra (horní tři záznamy) a simultánní záznam tří elektrogramů (dolní tři záznamy).

11 POHYBOVÝ ARTEFAKT V ZÁZNAMECH AKČNÍHO NAPĚTÍ

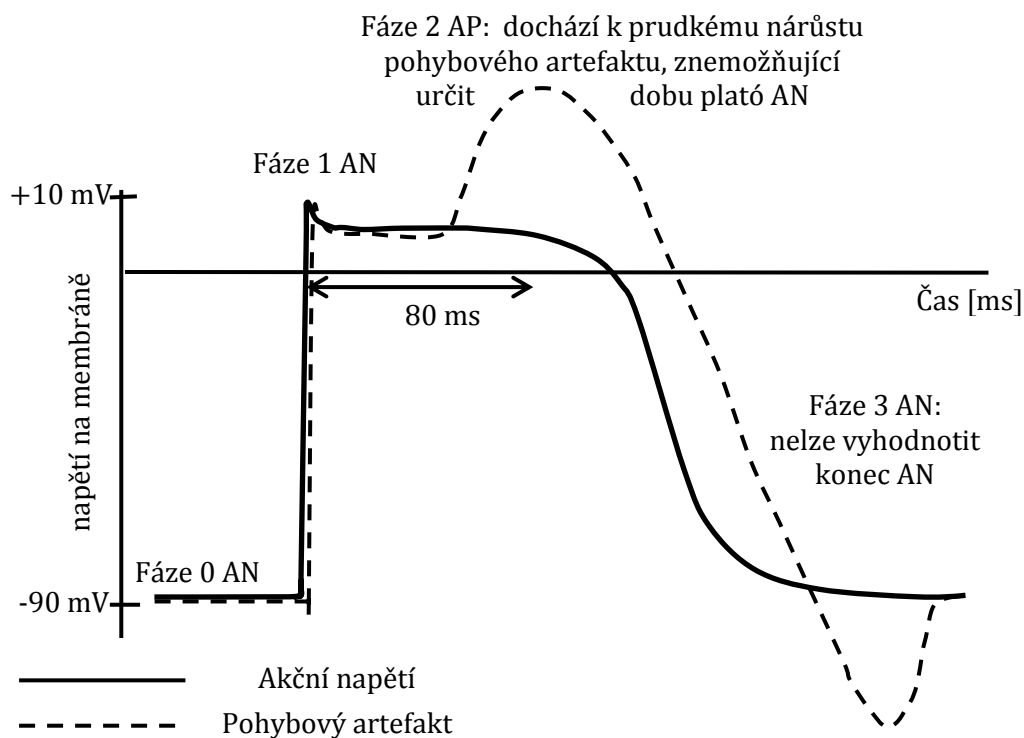
PA viditelně deformuje průběh AN ve většině záznamů pořízených optickou cestou. Na vzniku PA v zaznamenaných optických signálech se podílí několik faktorů. Těmito faktory jsou: změna proximálně-distální vzdálenosti srdeční stěny od fotodetektoru, popsaná v kapitole 4.1.1, změna počtu molekul VSD v zorném poli fotodetektoru, popsaná v kapitole 4.1.2, a změna optických vlastností srdeční tkáně během pohybu srdce, popsaná v kapitole 4.1.3.

11.1 Akční napětí ovlivněné pohybovým artefaktem

Optické záznamy AN, modulované PA, nabývají různých podob, protože průběh PA je do značné míry nepředpověditelný. PA je důsledkem pohybu izolovaného srdce a jako takový je výsledkem komplexních fyziologicko-mechanických mechanismů, jejichž součinnost je odlišná jak mezi zástupci stejného živočišného druhu, tak i v samotném průběhu experimentu. Není také dostatečně detailně známo, jak PA ovlivňují změny experimentálních podmínek, jako je například omezení průtoku krve způsobující ischemii. PA proto dosud nebyl vhodně kvantifikován a nejsou známy jeho průběhy pro izolovaná srdce laboratorního potkana.

Přesto byly nalezeny dva parametry, které jsou vlastní všem repetitivním zaznamenaného signálu tvořeného kombinací AN a PA. Těmito parametry jsou čas výskytu nejvýraznějšího vlivu PA a absence skokových změn záznamu AN v době jeho trvání. PA se v záznamu AN nejvýrazněji projeví přibližně 80 – 100 ms po začátku depolarizační fáze AN [101]. Tato prodleva je způsobena excitačně-kontraktilními vazbami mezi elektrickým a mechanickým aparátem myokardu. Nárůst PA se tak časově překrývá s druhou fází AN jak zobrazuje obrázek (Obrázek 11.1). Skokové změny v záznamu AN zarušeném PA nemohou nastat proto, že pohyb srdce, jeho kontrakce i jeho prostorové natočení jsou děje probíhající na fyzickém a hmotném objektu, které má svou vlastní setrvačnost.

Schematická ilustrace průběhu AN nepříznivě ovlivněného PA je zobrazena na obrázku (Obrázek 11.1). Časový průběh intenzity světla vyjadřující AN, zobrazený plnou čarou, je modulován artefakty vzniklými kontrakcí srdce, a je zobrazen přerušovanou čarou.

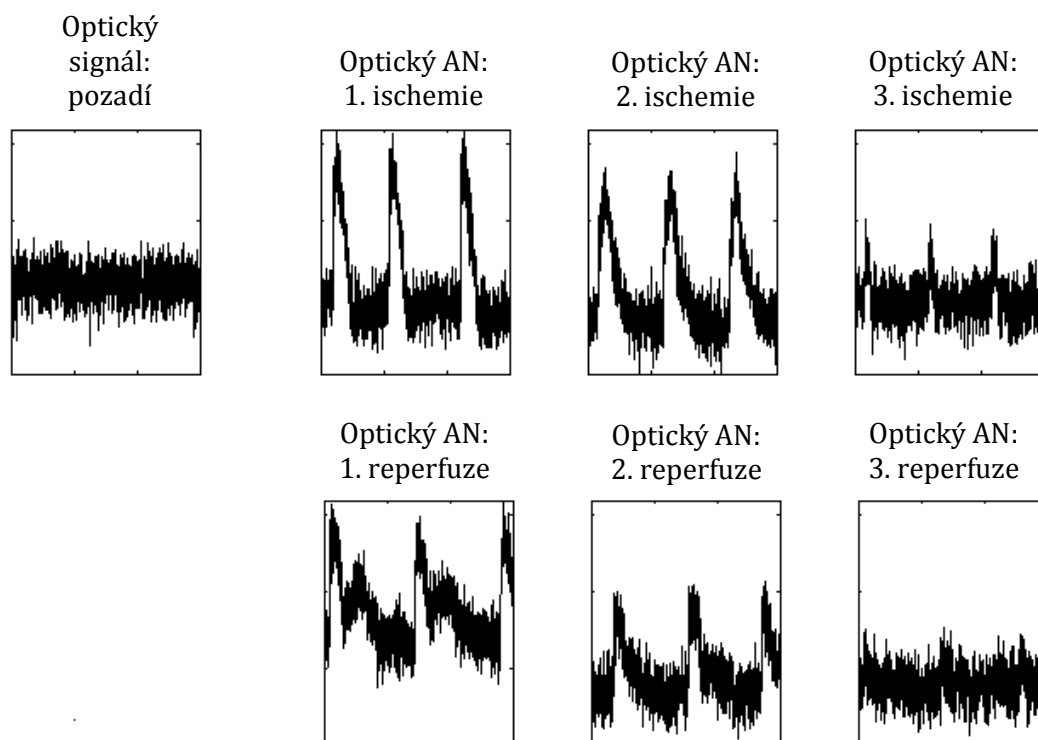


Obrázek 11.1: Časový průběh akčního napětí (plnou čarou) a akčního napětí s pohybovým artefaktem (přerušovanou čarou).

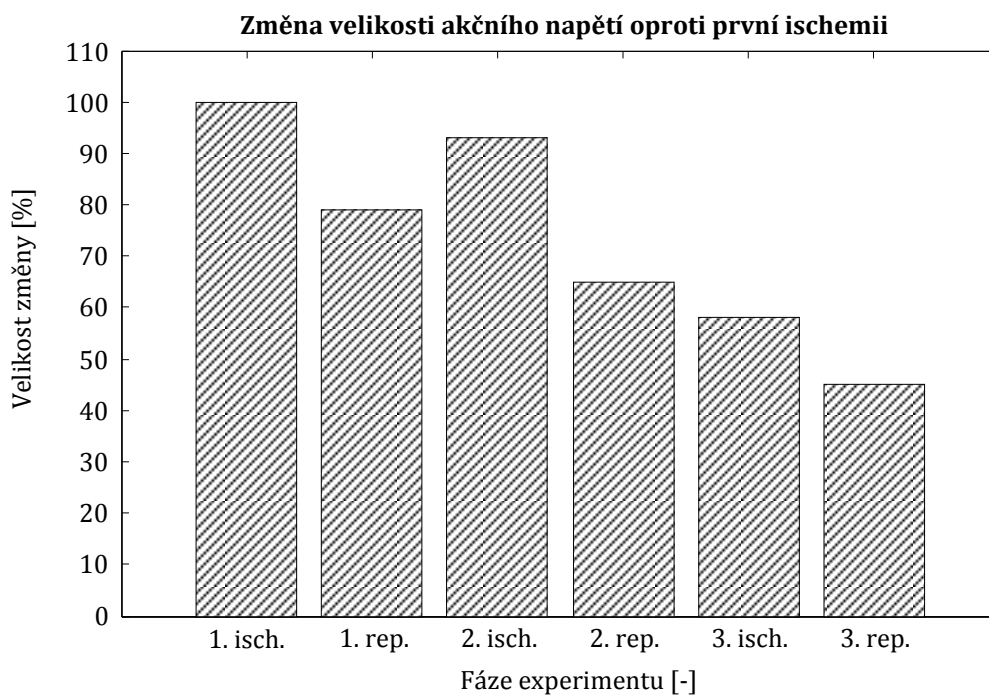
11.2 Časový vývoj pohybového artefaktu

Intenzita pohybu, stejně jako velikost maximální výchylky PA, v průběhu experimentu nezůstává konstantní, ale klesá s únavou srdce. Velmi výrazně se na vývoji PA podílejí ischemie, kterými srdce prochází při uměle vyvolaných krátkodobých periodách globální okluze perfuzátu. Jak ilustruje obrázek (Obrázek 11.2), zobrazující optické signály tvořené kombinací AN a AP, během první ischemie se PA příliš neprojevuje, což je vidět na nezkreslené podobě AN. Zato po odeznění ischemie v době reperfuze je vliv PA natolik dominantní, že zcela znemožňuje vyhodnocení tvaru AN. Obdobná situace nastává při opakované ischemii a po jejím skončení v době reperfuze. Při třetím opakování globální ischemie je již patrné, že se AN a PA ztrácí v šumu.

Spolu se snižováním výchylky PA při opakovaném vystavení srdce ischemickým podmínkám klesá i okamžitá výchylka AN. Snižování maximální výchylky AN způsobené opakováním globální ischemie je patrné z obrázku (Obrázek 11.3).



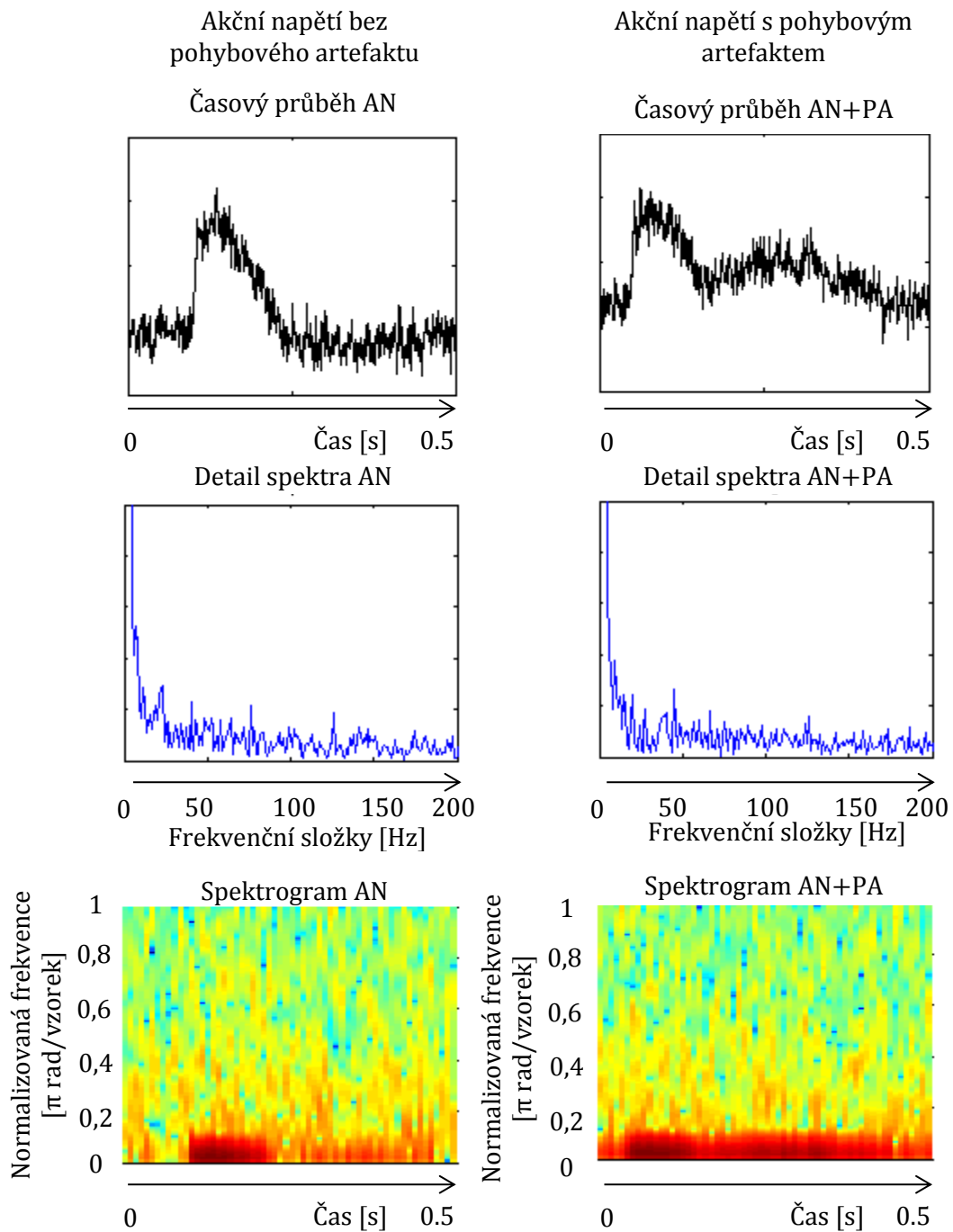
Obrázek 11.2: Časový vývoj (nepředzpracovaných) průběhů akčního napětí během opakovaných ischemií. Horní řada - opakované ischemie; dolní řada - k ischemiím příslušející reperfuze.



Obrázek 11.3: Velikost akčního napětí během opakovaných ischemií.

11.3 Frekvenční obsah pohybového artefaktu

Frekvenční rozsah PA se překrývá s frekvenčním rozsahem AN. Na obrázku (Obrázek 11.4) jsou zobrazeny detaily frekvenčních spekter signálu tvořeného pouze AN, a signálu tvořeného kombinací AN a PA. Z detailů obou spekter patrné, že PA nelze odstranit metodami založenými na filtraci signálu. Spektrogramy na obrázku (Obrázek 11.4) ukazují překryv obou signálů v čase i překryv ve spektrálním rozsahu.

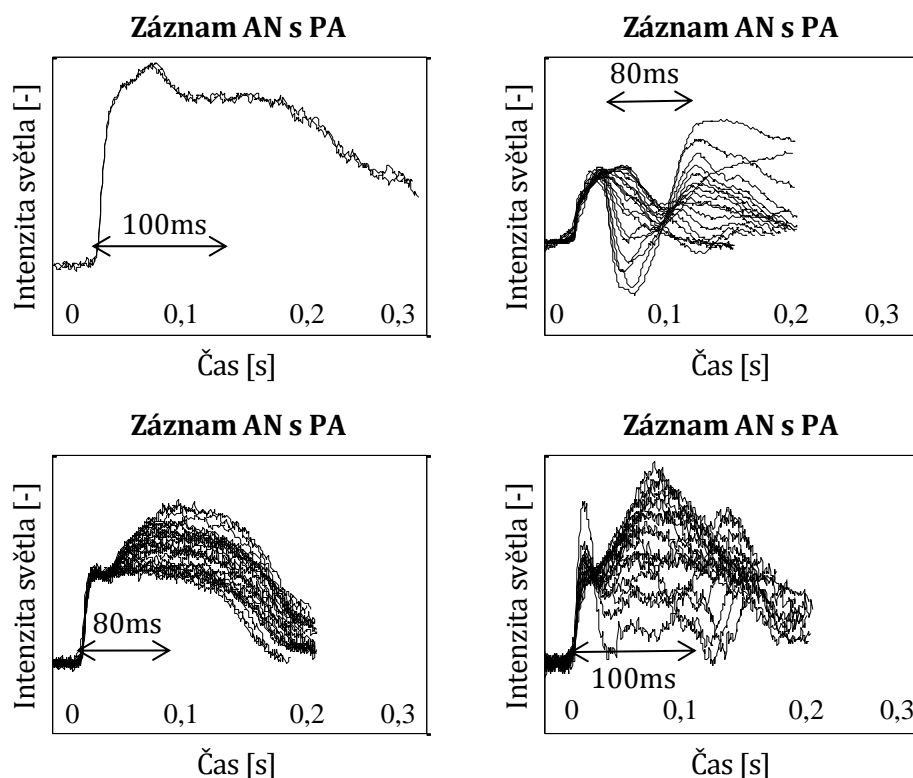


Obrázek 11.4: Průběhy AN a AN+PA a jejich spektrogramy.

11.4 Variabilita pohybového artefaktu v záznamech akčního napětí

Průběh PA je vysoce variabilní a tím i nepredikovatelný. Průběhy PA pro jednotlivá izolovaná srdce se vzájemně liší. Mimo této interindividuální variability dochází také k intraindividuální variabilitě, která se projevuje nestejnými průběhy PA v různých fázích dlouhodobého záznamu.

Ukázky reálně záznamených průběhů AN ovlivněných PA jsou zobrazeny na obrázku (Obrázek 11.5). Obrázek zobrazuje čtyři podobrázky, z nichž každý zobrazuje několik repetitivních AN zarušených PA, vždy z jiného izolovaného srdce. Průběhy v rámci podobrázku pocházejí ze stejného izolovaného srdce, ale jsou snímány v odlišných časech. Rozdíly mezi průběhy PA v jednotlivých srdcích jsou způsobeny individuální anatomicko-fyziologickou charakteristikou měřeného orgánu, rozdíly v rámci experimentu na stejném srdci jsou způsobeny změnou excitačně-kontraktilní vazby během globální ischemie, která je opakovaně vyvolávána během záznamu AN. I přes vysokou variabilitu záznamů je možné určit, že okamžik maximální výchylky PA se nachází mezi 80 – 100 ms od začátku depolarizační fáze AN, tak jako to bylo představeno v kapitole 11.1.



Obrázek 11.5: Záznamy repetitivních AN s PA pro čtyři izolovaná srdce.

12 POTLAČENÍ POHYBOVÉHO ARTEFAKTU POMOCÍ ICA

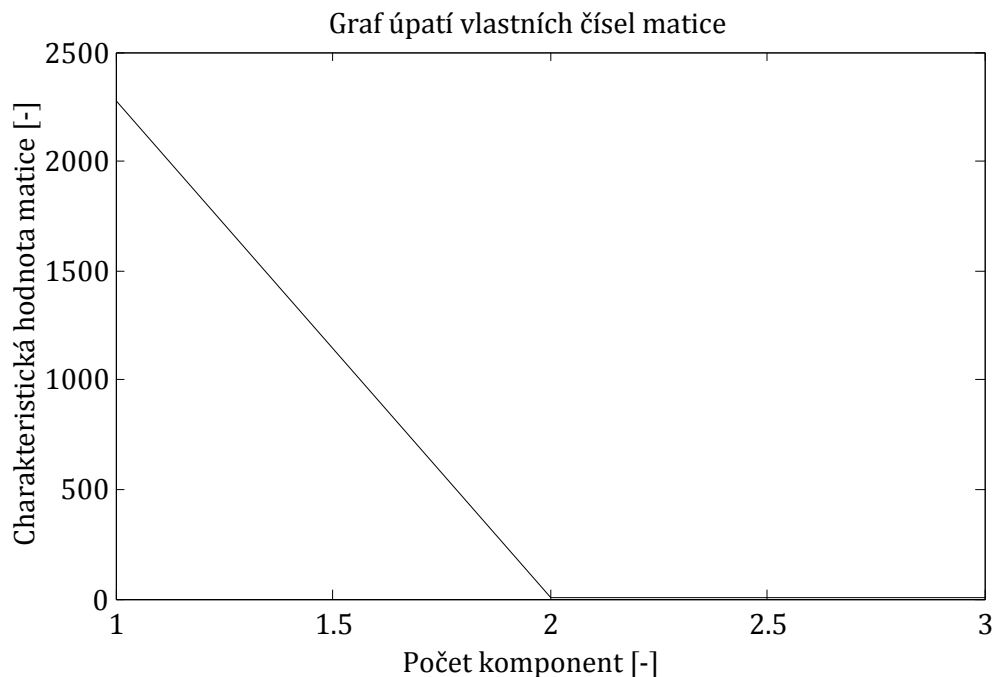
V této práci je představen přístup k potlačení PA založený na využití metody ICA. ICA patří z hlediska způsobu potlačení PA (kapitola 5) do skupiny výpočetních technik pro zpracování signálu.

12.1 Model ICA pro optický záznam AN

Pro separaci AN a PA z optických signálů je použit model ICA využívající časovou strukturu signálů, popsány v kapitole 7.2. Tento model ICA lépe odpovídá způsobu záznamu AN optickou metodou, než model pracující se signálem jako s vektorem náhodných proměnných.

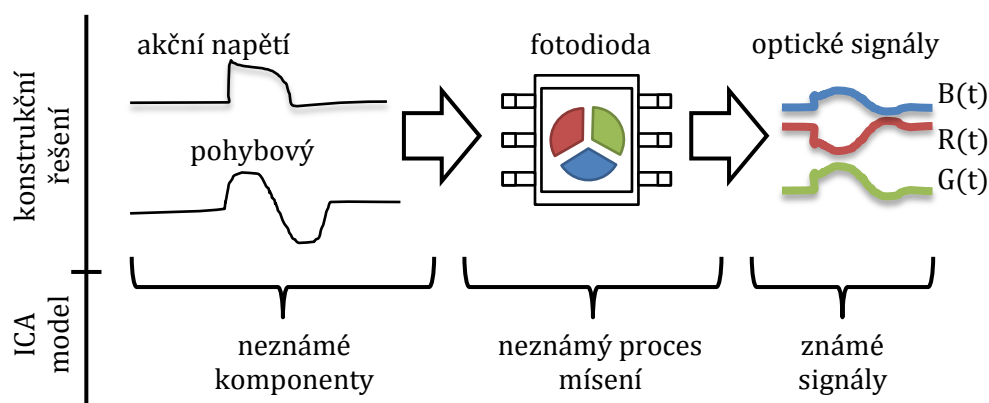
ICA separuje komponenty ze simultánně záznamovaných optických signálů. V praxi však nejsou známy komponenty těchto signálů, jejich počet, ani proces, kterým dochází k jejich smísení. Předpokládá se, že tři optické signály zaznamenané segmenty fotodiody jsou tvořeny kombinacemi AN a PA, případně mohou být signály navíc znehodnoceny šumem. Průběh AN, který je předmětem výzkumu, není samozřejmě předem znám. Stejně tak není znám průběh PA, neboť jeho tvar i velikost jsou pro každé izolované srdce individuální a kromě toho může docházet ke změnám tvaru a velikosti PA i během experimentu na konkrétním srdci. Použitý model ICA však apriorní znalost AN ani PA nevyžaduje.

Použitý model ICA pracuje s dvěmi komponentami. Počet komponent byl určen analýzou vlastních čísel korelační matice zaznamenaných optických signálů. Hodnoty vlastních čísel korelační matice byly sestupně seřazeny a vyjádřeny grafem úpatí vlastních čísel matice. Bod zlomu tohoto grafu se nachází na místě druhé komponenty (Obrázek 12.1), což dokazuje, že zaznamenané optické signály jsou tvořeny dvěmi komponentami. Analýza vlastních čísel korelační matice tak potvrdila teoretický předpoklad přítomnosti dvou komponent - AN a PA.



Obrázek 12.1: Odhad počtu separovaných komponent z optických signálů

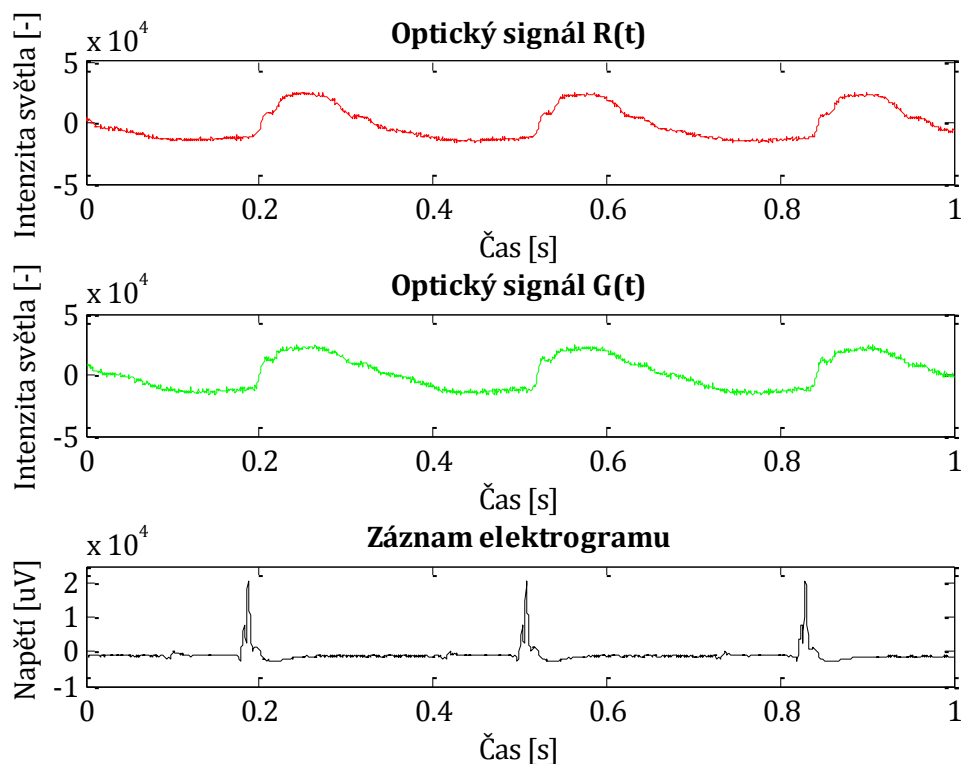
Vztah mezi modelem ICA a zaznamenávanými optickými signály vysvětluje obrázek (Obrázek 12.2). Směs AN a PA je detekována segmentovou fotodiódou, přičemž mísení AN a PA představuje neznámý proces. Emisní světlo di-4-ANEPPS je detekováno v jednotlivých segmentech fotodiody. Výstupem jsou tři optické signály $R(t)$, $G(t)$, $B(t)$, které odpovídají záznamu změny intenzity světla v jednotlivých částech spektra (oblast červené, zelené a modré barvy). V případě využití ICA lze ze signálů $R(t)$, $G(t)$, $B(t)$ oddělit maximálně tři komponenty, jelikož počet komponent musí být menší nebo roven počtu vstupních signálů. Tím je podmínka dostatečného počtu vstupních signálů pro separaci AN a PA splněna.



Obrázek 12.2: Vztah konstrukčního řešení záznamové aparatury a modelu ICA

Pro účely separace dvou komponent AN a PA jsou použity dva optické signály,

zelený a červený. Využití optických signálů z červené a zelené oblasti spektra vychází z principu funkce VSD (kapitola 3). Ukázky signálů $R(t)$, $G(t)$ jsou na obrázku (Obrázek 12.3) v jeho horní a prostřední části. Ve spodní části obrázku je zobrazen záznam elektrogramu. Pozice začátků AN, zrušených PA, přibližně určuje R vlna elektrogramu simultánně zaznamenaného spolu s optickými signály.



Obrázek 12.3: Zaznamenané optické signály $R(t)$ a $G(t)$, doplněné elektrogramem.

Matematicky lze vznik obou optických signálů $R(t)$ a $G(t)$ popsat soustavou dvou rovnic:

$$\begin{aligned} R(t) &= a_{11}AN(t) + a_{12}PA(t) \\ G(t) &= a_{21}AN(t) + a_{22}PA(t) \end{aligned} \tag{12.1}$$

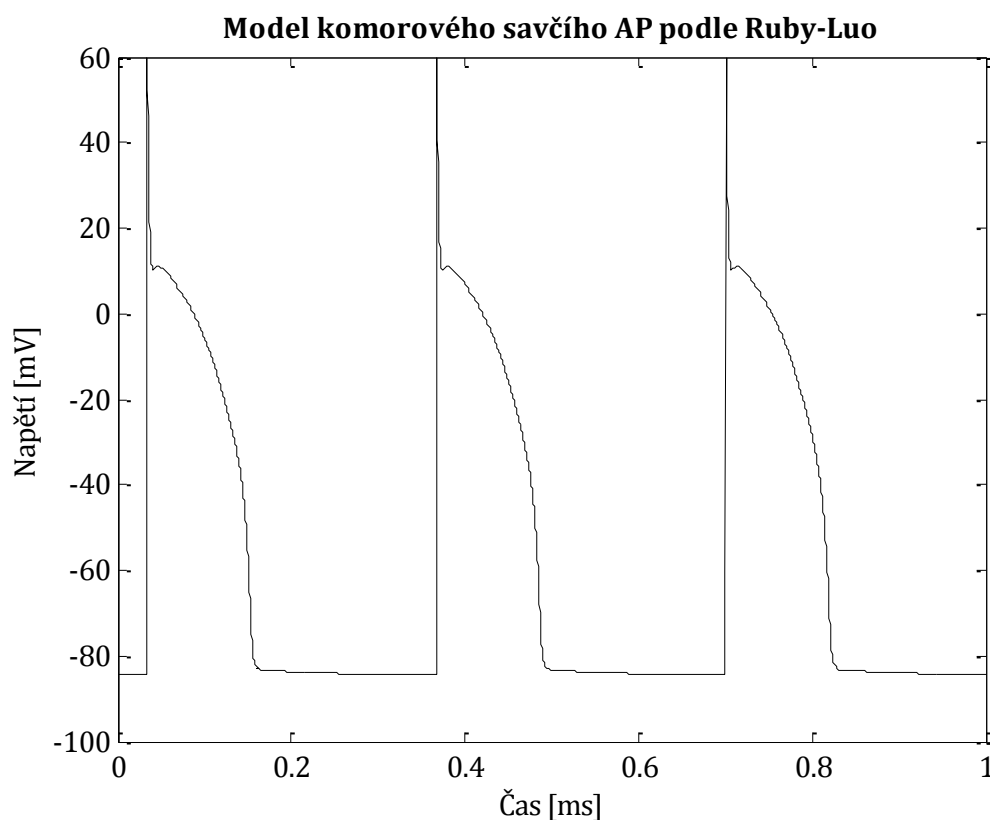
kde $R(t)$ je signál zaznamenaný v červené oblasti spektra, $G(t)$ signál zaznamenaný v zelené oblasti spektra, $a_{11}, a_{12}, a_{21}, a_{22}$ představují v čase neměnné prvky mixážní matice vyjadřující proces smíchání komponent ve fotodiodě, a $AN(t)$ a $PA(t)$ jsou časové průběhy komponent představující průběhy AN a PA.

12.2 Ověření platnosti podmínek modelu ICA pro optický záznam akčního napětí

Pro ověření platnosti podmínek ICA byly vytvořeny simulované optické signály, složené z kombinace modelového průběhu AN a PA. Simulace optických signálů umožňuje pracovat s průběhem AN, který je u reálných dat neznámou veličinou.

12.2.1 Charakteristika akčního napětí z pohledu ICA

Průběh AN je fyziologicky determinován a je pro daný živočišný druh charakteristický. Průběhy AN získané během experimentů odpovídají simulovaným průběhům AN vytvořeným pomocí modelu autorů Luo-Rudy z roku 1991 [102]. Jedná se o matematický model komorového srdečního AN, poskytující dostatečně detailní průběh membránového napětí buňky s využitím šesti iontových kanálů. Model Luo-Rudy 1991 byl implementován v prostředí OpenCell [103]. Z OpenCell prostředí byl model přenesen [104] do prostředí Matlab, kde byl vygenerován průběh obsahující tři repetice AN. Průběh AN je zobrazen na obrázku (Obrázek 12.4).



Obrázek 12.4: Modelový průběh akčního napětí.

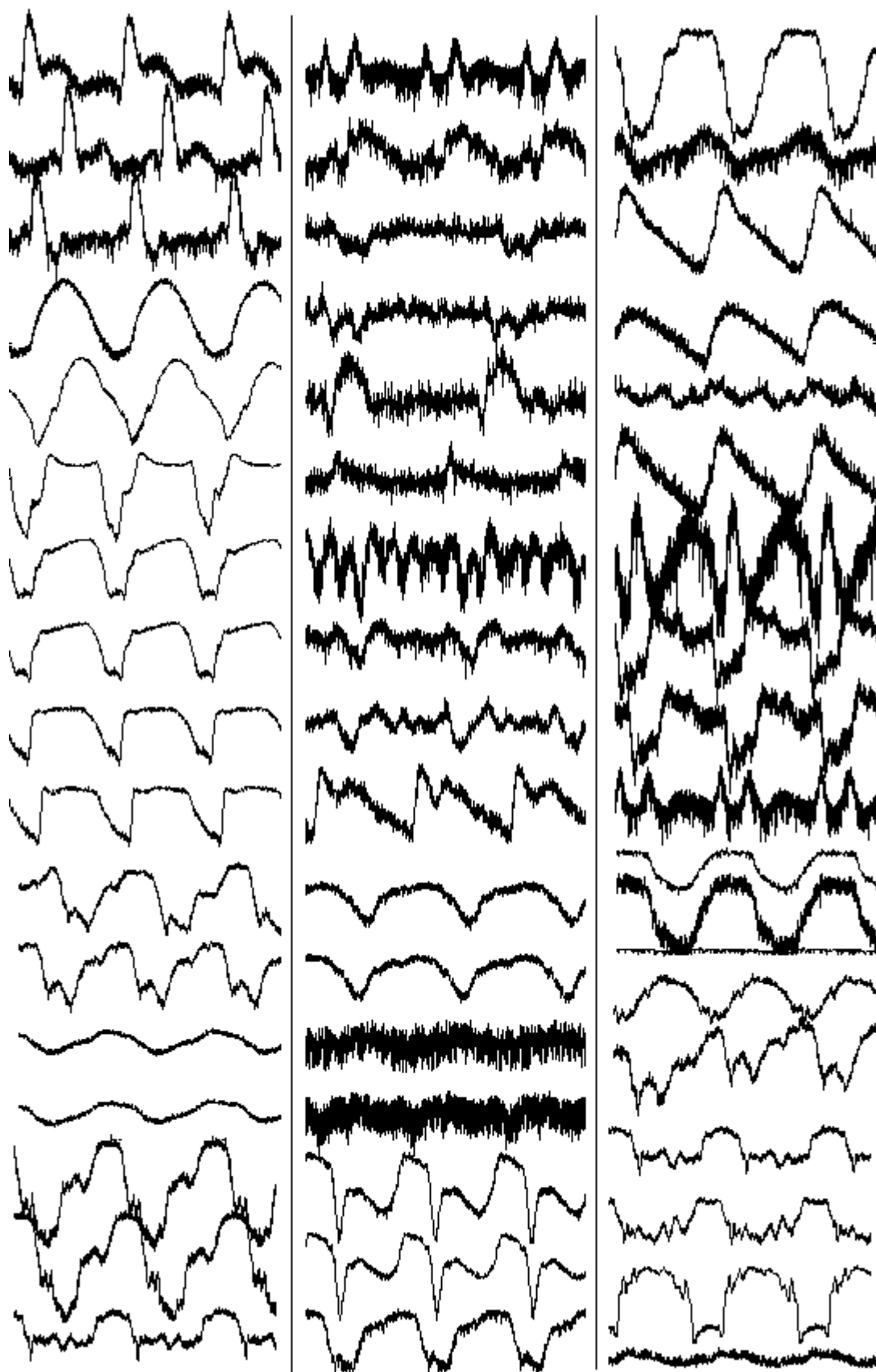
12.2.2 Charakteristika pohybového artefaktu z pohledu ICA

Charakteristické průběhy PA byly získány z optických záznamů v době před nabarvením srdce VSD. V této době nevyzařovalo srdce žádné emisní světlo a při excitaci srdce mohlo být detekováno pouze odražené excitační světlo. Intenzita

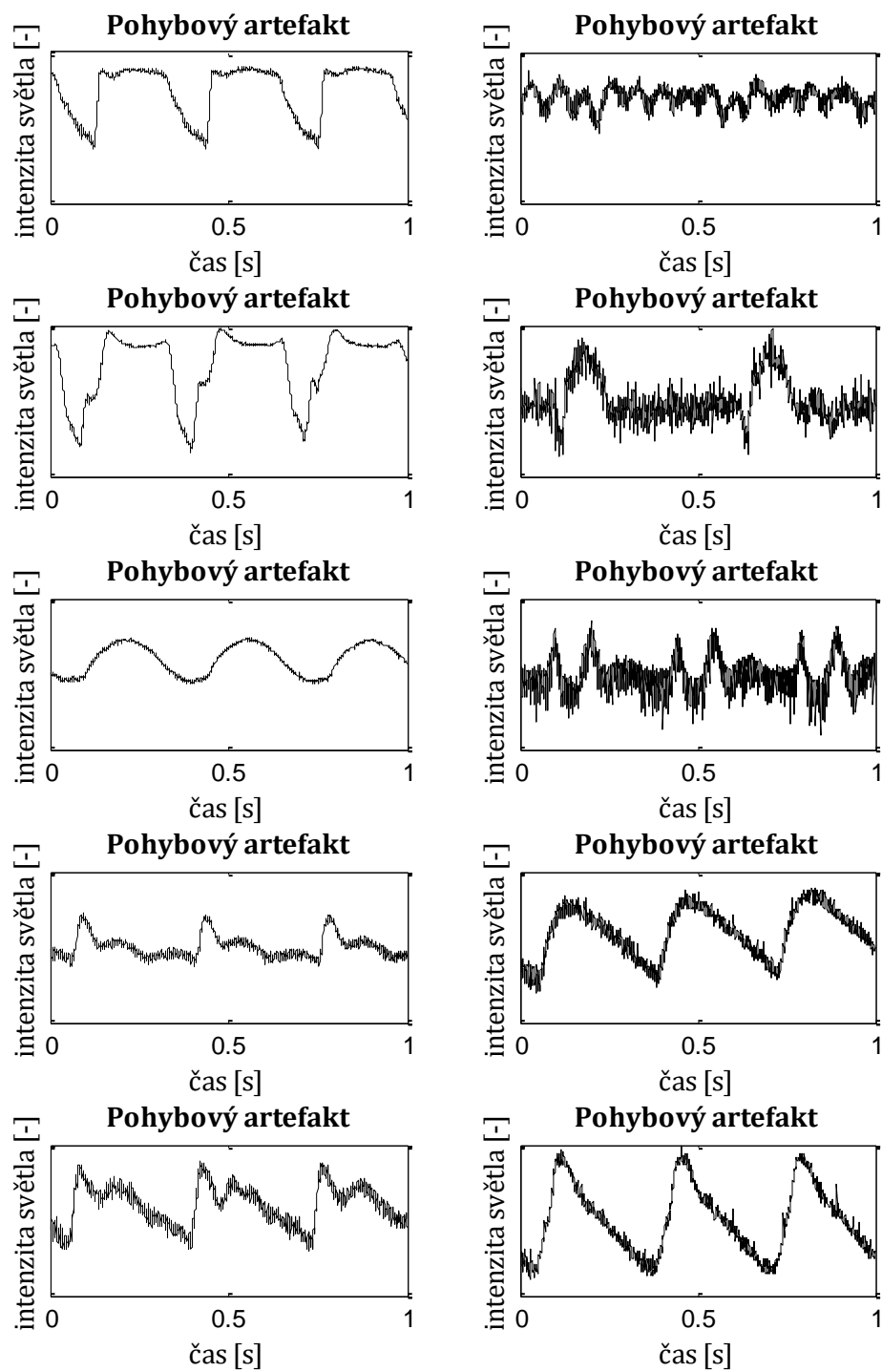
odraženého světla se měnila v závislosti na pohybu srdce, a tak bylo možné PA zaznamenat. Odražené světlo bylo zaznamenáno jako signál v modré oblasti spektra, signály v červené a zelené oblasti zůstaly nevyužité.

Záznamem odraženého světla z povrchu izolovaného srdce bylo získáno 53 průběhů PA z dvanácti izolovaných srdcí laboratorních zvířat. Jednotlivé průběhy PA se od sebe značně liší, viz obrázek (Obrázek 12.5). Odlišnost jednotlivých průběhů je tak vysoká, že znemožňuje vytvoření vzorového průběhu PA. Subtrakce vzorového průběhu z naměřených optických signálů proto nemůže být použita jako technika odstranění PA.

Pro účely analýzy ICA bylo vybráno deset reprezentativních průběhů PA. Byly vybrány maximálně odlišné průběhy, aby ověření schopnosti separace jednotlivých ICA variant pokrývalo celé spektrum změn PA. Deset vybraných reprezentantů je zobrazeno na obrázku (Obrázek 12.6).



Obrázek 12.5: Ukázka variability tvaru pohybového artefaktu.



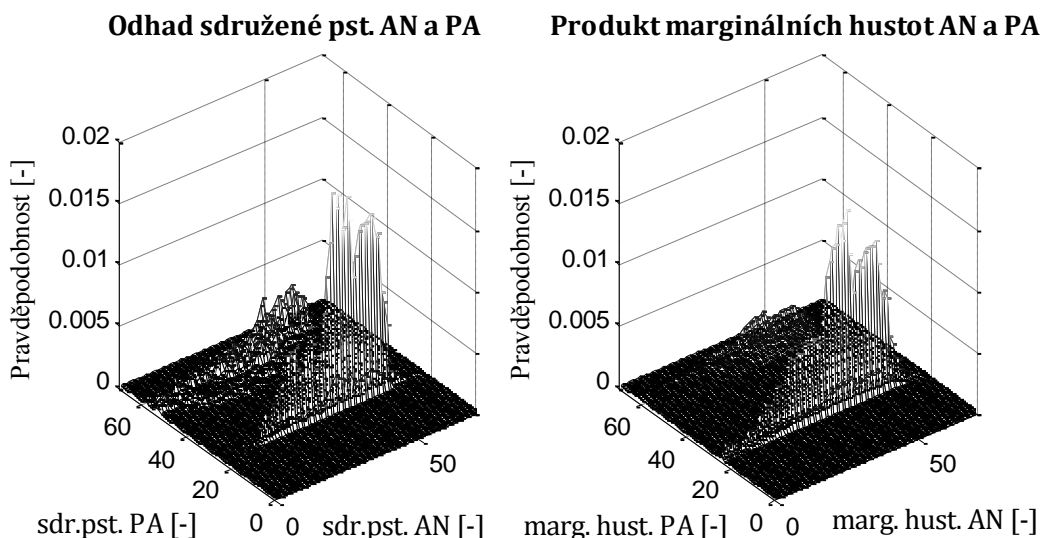
Obrázek 12.6: Deset vybraných záznamů pohybového artefaktu.

12.2.3 Ověření statistické nezávislosti akčního napětí a pohybového artefaktu

Statistickou nezávislost komponent AN a PA, která je požadovaná pro korektní separaci pomocí ICA, lze posoudit pomocí funkcí hustoty pravděpodobnostního rozdělení (viz rovnice 7.6 v kapitole 7.4) komponent AN a PA. Funkce hustoty pravděpodobnostního rozdělení komponent AN a PA však nejsou předem známy a proto byly odhadnuty pomocí dvojdimenzionálního jádrového odhadu hustoty [105].

Odhad sdružené hustoty pravděpodobnosti náhodně zvolené kombinace AN a PA je dvojdimenzionální matice dat, zobrazená na obrázku (Obrázek 12.7) vlevo. Obrázek (Obrázek 12.7) vlevo zároveň vizualizuje levou stranu rovnice 7.6.

Pravou stranu rovnice 7.6 tvoří součin marginálních hustot AN a PA. Marginální hustoty pravděpodobnosti jsou spočteny podle vztahů 7.7 a 7.8. Součin marginálních hustot je opět dvojdimenzionální matice stejných rozměrů, jako matice odhadu sdružené hustoty pravděpodobnosti. Tato matice je zobrazena na obrázku (Obrázek 12.7) vpravo.



Obrázek 12.7: Vlevo - odhad sdružené pravděpodobnosti (sdr. pst.) AN a PA; vpravo - součin odhadu marginálních hustot (marg. hust.) pro AN a PA.

Podle rovnice 7.6 by se měl odhad sdružené hustoty pravděpodobnosti v případě statistické nezávislosti posuzovaných komponent AN a PA rovnat součinu marginálních hustot pravděpodobnosti. To znamená, že v případě statistické nezávislosti signálů AN a PA by měly odhady zobrazené na levé a pravé straně obrázku (Obrázek 12.7) vypadat stejně. Ve vykresleném případě vypadají obrázky velmi podobně, a dá se tedy říci, že signály jsou vzájemně skoro nezávislé. Přesto nedochází k úplné rovnosti.

Mírná vzájemná statistická závislost posuzovaných signálů může být způsobena fyziologickou vazbou mezi elektrickou a mechanickou aktivitou srdce. Elektrická aktivita srdce přímo řídí jeho mechanickou aktivitu, takže z hlediska časového průběhu obou signálů skutečně existuje mezi oběma signály významná vazba. Statistická závislost však nepopisuje časové souvislosti posuzovaných signálů, ale hustoty pravděpodobností signálů. Vzájemná statistická závislost proto nevyjadřuje fyziologickou závislost AN na PA a proto tyto vazby nelimitují použití ICA.

Experimentálně bylo ověřeno, že vzájemná statistická závislost je u každého z deseti zkoumaných typů PA natolik malá, že nepředstavuje překážku korektní separaci komponent pomocí ICA. ICA totiž separuje komponenty na základě minimalizace kritéria popisujícího míru vzájemné závislosti těchto komponent. Globální minimum cenové funkce lze nalézt vždy, nezávisle na tom, jaké hodnotě vzájemné závislosti minimum odpovídá. V praxi tak ICA funguje korektně nejen pro zcela nezávislé signály, ale i pro signály vzájemně mírně závislé.

Míru vzájemné závislosti lze kvantifikovat, v tomto případě je pro kvantifikaci vzájemné statistické závislosti zvolena veličina vzájemná informace. Vzájemná informace dvou náhodných funkcí X a Y lze spočítat podle vztahu [75]:

$$I(X; Y) = \iint_{X,Y} p(x, y) \log \left(\frac{p(x, y)}{p(x)p(y)} \right) dx dy \quad 12.2$$

kde $I(X; Y)$ je vzájemná informace, $p(x, y)$ je sdružená hustota pravděpodobnosti náhodných veličin X a Y , a $p(x)$ a $p(y)$ jsou marginální pravděpodobnostní hustoty funkcí X a Y . Veličina vzájemná informace kvantifikuje závislost náhodných proměnných tak, že $I(X, Y) = 0$ tehdy, a jen tehdy, když X a Y jsou vzájemně nezávislé.

Vzájemná nezávislost AN a PA je vyjádřena vzájemnou informací, jejíž hodnota by měla být nulová, nebo by měla být alespoň dostatečně malá. Vzájemná informace vzorových deseti kombinací AN a PA byla určena na základě odhadnuté hustoty pravděpodobnosti [106]. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 12.1).

Tabulka 12.1: Odhad vzájemné informace $I(\text{AN}, \text{PA}_i)$ pro deset kombinací AN a PA.

	PA 1	PA 2	PA 3	PA 4	PA 5	PA 6	PA 7	PA 8	PA 9	PA 10
$I(\text{AN}, \text{PA}_i)$	0,51	0,77	0,77	0,16	0,31	0,86	0,52	0,40	0,44	0,66
	Průměrná vzájemná informace									
$I(\text{AN}, \text{PA})$	$0,54 \pm 0,21$									

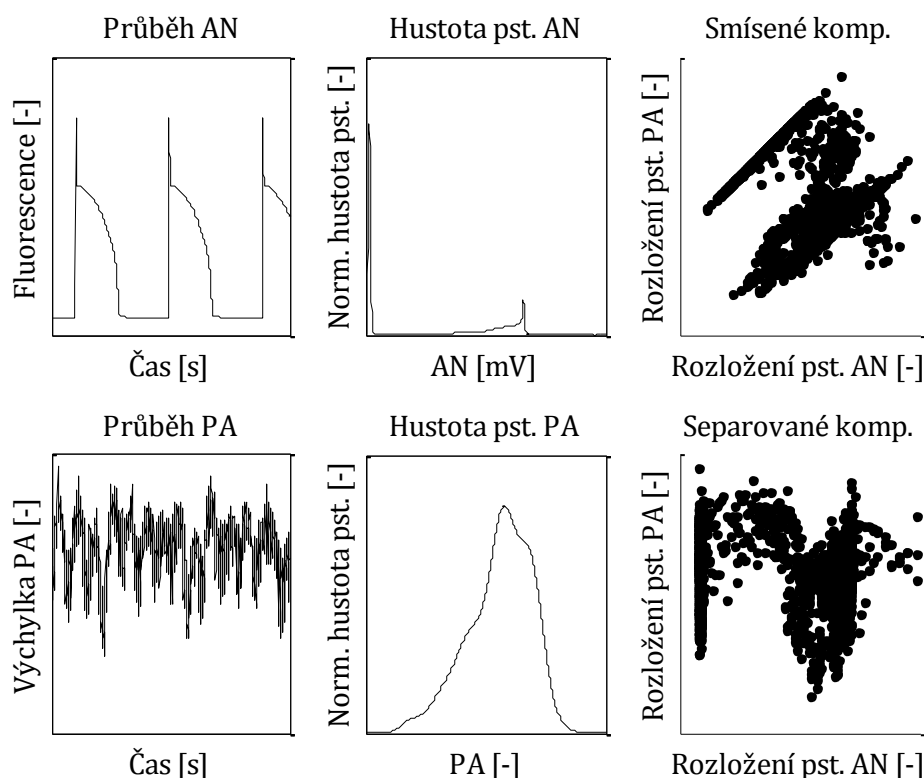
Vzájemná informace dosahovala průměrné hodnoty $I(\text{AN}, \text{PA}) = 0,54 \pm 0,21$. Číslo je uváděno bez jednotky, neboť vzájemná informace je bezrozměrná. Experimentálně bylo zjištěno, že ICA dokáže separovat AN a PA ze všech deseti zkoumaných vzorků. Z průměrné hodnoty vzájemné informace plyne, že jsou AN a PA mírně závislé a ICA proto může být použita i pro mírně statisticky závislé signály.

13 TEORETICKÝ VÝBĚR VARIANTY ICA

V předchozí kapitole bylo dokázáno, že matematický model ICA lze použít pro separaci AN a PA z optických záznamů. V této kapitole bude vybrána optimální varianta ICA.

13.1 Vlastnosti ICA pracující se signály jako s náhodnými veličinami

Skutečné komponenty AN a PA mají nerovnoměrné pravděpodobnostní rozložení. Proto ani jejich sdružená hustota pravděpodobnosti není rovnoměrně rozložena na čtvercové ploše, jako tomu bylo na obrázku (Obrázek 8.1). V případě reálných komponent nejsou všechny hrany patrné, jak je to vidět v pravé části obrázku (Obrázek 13.1), zobrazující průběhy, pravděpodobnostní hustoty a korelační diagramy komponent AN a PA.



Obrázek 13.1: Záznam AN a PA (vlevo), hustoty pravděpodobnosti pro AN a PA (uprostřed), a korelační diagramy smíšených a separovaných komponent (vpravo).

Přístupy ICA, založené na hledání hran paralelogramu, proto nejsou pro separaci AN a PA vhodné. Tyto přístupy jsou náchylné k náhodným výchylkám hodnot zaznamenávaného signálu, (to je např. podstatný problém při použití ICA využívající maximalizaci negaussovitosti kvantifikací čtvrtého kumulantu signálu, tzv. koeficientu špičatosti) a mohou být závislé na přesnosti odhadu spektra (např. ICA využívající

odhad věrohodnosti). Šum a nepřesný odhad spektra pak degradují korektnost separace.

Z uvedených důvodů jsou pro separaci PA a AN vhodnější novější přístupy využívající časovou strukturu signálů. Tyto sofistikovanější metody jsou představeny v kapitole 13.2.

13.2 Vlastnosti ICA využívající časovou strukturu signálů

Variety využívající časovou strukturu separovaných komponent jsou pro separaci AN a PA vhodnější. Srovnání teoretických limitů variant ICA je náplní následujících kapitol.

13.2.1 Vlastnosti algoritmu AMUSE

Algoritmus AMUSE, popsáný v kapitole 8.2.1, je výpočetně málo náročný. Na druhou stranu má i dvě nevýhody.

První nevýhodou AMUSE je, že funguje pouze tehdy, jsou-li vlastní vektory korelační matice \mathbf{C}_τ^Z , popsané v kapitole 8.2.1, unikátní. Tento případ nastává, pokud jsou všechna vlastní čísla matice \mathbf{C}_τ^Z vzájemně odlišná. Pokud jsou některá z vlastních čísel sobě rovná, pak příslušný vlastní vektor nemůže být identifikován a k němu vázaná komponenta nemůže být v takovém případě pomocí AMUSE odhadnuta. Tato situace může nastat, pokud jsou kovariance časově posunutých komponent AN a PA stejné. Vzhledem k tomu, že AN a PA nejsou dopředu známy a mají stochastický charakter, nelze tuto nepříznivou možnost úplně vyloučit. Modifikace AMUSE, která obchází toto omezení, spočívá v použití vhodného časového posuvu τ , který kromě typické hodnoty 1 může nabývat alternativních hodnot 2, 3, 4, atd. Pro korektní funkci AMUSE stačí nalézt jedinou hodnotu τ , pro kterou platí, že jsou kovariance odlišné. Volbu vhodného τ však nelze provést automatizovaně a musí být provedena uživatelsky, což vnáší do celého procesu odhadu AN a PA prvek, který může zkreslit výsledky ICA. Tato skutečnost snižuje spolehlivost AMUSE.

Druhou, mnohem závažnější, nevýhodou AMUSE je náchylnost algoritmu k nekorektní separaci v prostředí šumu. Bylo dokázáno [76], že korektnost AMUSE významně klesá, jsou-li vstupní data zarušena šumem. Zaznamenané optické signály $R(t)$ a $G(t)$ ze segmentové fotodiody jsou výrazně zarušeny šumem. Lze to vidět například z obrázku (Obrázek 12.3). Určení separační matice na základě pouze jedné kovarianční matice časově posunutých signálů často vede v praxi k získání nekorektních nebo nedostatečně přesných výsledků separace pro zašuměné signály, protože nepřesné určení vlastních čísel kovarianční matice pro posun $\tau = 0$ vede ke ztrátě informace obsažené v kovarianční matici pro posun $\tau = 1$ [76]. Vliv šumu na korektnost AMUSE je obzvláště nepříznivý v případě, že počet odhadovaných komponent je stejně velký jako počet snímačů [107], což je případ separace AN a PA z optických signálů $R(t)$ a $G(t)$. Z teoretického hlediska proto není AMUSE pro separaci AN a PA komponent vhodná.

13.2.2 Vlastnosti algoritmu SOBI

Optimálnější variantou ICA je algoritmus SOBI [78], popsáný v kapitole 8.2.2, a

jeho deriváty. SOBI využívá k separaci komponent sérii vzájemně posunutých korelačních matic, na rozdíl od AMUSE, která využívá pouze jedinou posunutou kovarianční matici. Počet vzájemně posunutých korelačních matic použitých v procesu odhadu separační matice ovlivňuje robustnost algoritmické realizace a zároveň eliminuje vliv nesprávné uživatelské volby τ . Tímto přístupem se zvyšuje robustnost ICA algoritmu proti vlivu šumu a zvyšuje se jeho přesnost [108], [91], [92], [109].

Kromě robustnosti je výhodou SOBI i existence výkonných numerických algoritmů pro výpočet sdružené aproximativní diagonalizace [108]. Na druhou stranu je SOBI výpočetně náročnější než AMUSE. Při separaci pouze dvou komponent, $AN(t)$ a $PA(t)$, však není nutné výpočetní náročnost zohlednit.

Pro reálné optické záznamy $R(t)$ a $G(t)$ (tj. signály obsahující šum a nepřesnosti) není přesná diagonalizace pomocí rozkladu matice na vlastní čísla možná, protože vlastní vektory korelačních matic v čase vzájemně posunutých signálů nejsou zcela identické, jako by tomu bylo v ideálním teoretickém případě. SOBI proto využívá přibližnou sdruženou diagonalizaci série korelačních matic, a míru diagonalizace vyjadřuje účelovou funkcí, již minimalizuje. Tento přístup je v případě zašuměných dat efektivnější [76].

Popularita SOBI vyústila v několik rozšíření tohoto algoritmu [109], [110], [111]. Rozšíření SOBI jsou popsána v následujících odstavcích s přihlédnutím na jejich vhodnost k separaci komponent z opticky zaznamenaných signálů $R(t)$ a $G(t)$ s délkou odpovídající několika jednotkám až desítkám repetitivních AN. Optické signály s touto délkou jsou dostatečně dlouhé na to, aby mohl být odhad separační matice dostatečně robustní, a zároveň jsou dostatečně krátké na to, aby proces separace netrval dlouho.

- SOBI-RO využívá robustní proces předzpracování, zajišťující, že struktura vlastních čísel a vektorů kovarianční matice signálů nebude degenerovaná [79], [80]. Tímto způsobem SOBI-RO eliminuje možnou kaskádově se šířící chybu způsobenou hned v prvotní fázi běhu algoritmu při ortogonalizaci kovarianční matice pro časový posuv $\tau = 0$. Blíže o tomto problému bude pojednáno v kapitole 13.2.3, pojednávající o algoritmu WASOBI, jenž tuto chybu taky eliminuje. SOBI-RO je díky své robustnosti a díky eliminaci kaskádovitě šířené chyby pro separaci AN a PA z teoretického hlediska vhodný.
- SOBI-BPF provádí přibližnou sdruženou diagonalizaci souboru signálů předem filtrovaných bankou filtrů s vzájemně se překrývajícími pásmy propustnosti [112], [113], [114]. Vhodně navržená sada filtrů s pásmy propustnosti pokrývajícími spektrální rozsah všech komponent, umožňuje odstranit šum nacházející se mimo frekvenční rozsah komponent. Návrh sady filtrů vychází ze znalosti spektrálních charakteristik odhadovaných komponent, které však musí být předem známé. V případě $AN(t)$ lze jeho spektrální charakteristiku alespoň přibližně odhadnout, v případě $PA(t)$ však informace o spektrálních vlastnostech chybí. SOBI-BPF proto představuje derivát SOBI, který není pro separaci AN a PA vhodný.
- SONS před provedením přibližné sdružené diagonalizace rozdělí signály na vzájemně se nepřekrývající úseky signálu a kovarianční matice počítá z těchto rozdělených úseků podobně, jako to dělá SOBI z celých signálů [115], [116]. SONS je zobecnění SOBI umožňující separovat nestacionární komponenty [115],

[116], [117], [118], [119], což se odráží i v názvu metody (Second Order Nonstationary Source separation). Po sobě jdoucí repetice AN, doprovázené příslušným PA, lze však považovat v řádu jednotek až desítek sousledných repetice použitých pro separaci pomocí ICA za stacionární signály, neboť jejich pravděpodobnostní charakteristika se nemění s vlivem posunutí signálu, a komponenty mají stejnou střední hodnotu a rozptyl. Z toho důvodu není SONS pro separaci AN a PA vhodnou variantou ICA.

- Pro účely separace $AN(t)$ a $PA(t)$ ze zašuměných signálů $R(t)$ a $G(t)$ je nejvhodnější rozšíření SOBI využívající optimální váhování kovariančních matic. Toto rozšíření bylo svými autory označeno zkratkou WASOBI. Detailní popis je popsán v samostatné kapitole.

13.2.3 Vlastnosti algoritmu WASOBI

Varianta WASOBI představuje modifikaci varianty SOBI [81], [110]. WASOBI nahrazuje metodu aproximativní sdružené diagonalizace nelineární váhovanou metodou nejmenších čtverců. Tím je výrazně zvýšena přesnost separace ICA [81]. WASOBI dosahuje oproti SOBI lepších výsledků [81], zvláště v případech zašuměných dat.

Kromě toho WASOBI překonává omezení SOBI, spočívající v dvoufázovém zpracování korelačních matic algoritmem SOBI. Právě toto omezení signifikantně redukuje korektnost separace AN a PA.

Původní algoritmus SOBI je suboptimální z hlediska separační schopnosti, protože jeho algoritmus je rozdělen do dvou fází, přičemž jeho druhá část není optimalizovaná vzhledem k hledanému sdruženému diagonalizéru. V první fázi algoritmu SOBI je vybrána korelační matice signálů $\mathbf{R}_x[0]$ v čase $\tau = 0$. Proces bělení spočívá v nalezení bělicí matice \mathbf{W} zajišťující, že součin korelační matice s bělicí maticí je roven jednotkové matici:

$$\mathbf{W}\mathbf{R}_x[0]\mathbf{W}^H = \mathbf{I} \quad 13.1$$

kde \mathbf{W} je bělicí matice signálů, a $\mathbf{R}_x[0]$ je korelační matice signálů pro vzájemně neposunuté signály, a \mathbf{I} je jednotková matice.

Následně jsou stejnou bělicí maticí \mathbf{W} transformovány všechny ostatní korelační matice:

$$\mathbf{R}[\tau_k] = \mathbf{W}\mathbf{R}_x[\tau_k]\mathbf{W}^H \text{ pro } k = 1, 2, \dots, K. \quad 13.2$$

kde $\mathbf{R}[\tau_k]$ jsou transformované korelační matice pro posuv τ_k , \mathbf{W} je bělicí matice, $\mathbf{R}_x[\tau_k]$ jsou původní matice, a K označuje počet těchto matic.

V druhé fázi algoritmu SOBI jsou Jakobiho rotací [92] iterativně minimalizovány součty nediagonálních prvků transformovaných korelačních matic, čímž je získán přibližný unitární sdružený diagonalizér \mathbf{U} . Sdružený diagonalizér \mathbf{A} je pak získán jako

$$\mathbf{A} = \mathbf{W}^{-1}\mathbf{U} \quad 13.3$$

kde \mathbf{A} je sdružený diagonalizér, \mathbf{W}^{-1} je pseudoinverze bělicí matice \mathbf{W} , a \mathbf{U} je přibližný unitární sdružený diagonalizér.

Druhá fáze SOBI je optimalizovaná vzhledem k \mathbf{U} , ale nikoliv k \mathbf{A} [81], neboť neunitární část \mathbf{W} byla zvolena tak, aby přesně (nikoliv aproximativně) diagonalizovala $\mathbf{R}_x[0]$, i za cenu špatné diagonalizace ostatních matice $\mathbf{R}[\tau_k]$ pro $k = 1, 2, \dots, K$.

WASOBI, popsané v kapitole 8.2.3, omezení plynoucí z dvoufázového zpracování korelačních matic nevykazuje, a proto je pro separaci AN a PA nejvhodnější variantou ICA.

14 EMPIRICKÝ VÝBĚR ICA VARIANTY

Empirický výběr ICA varianty, zohledňující současně účelovou funkci i optimalizační algoritmus ICA, je obsahem této kapitoly.

14.1 Účelová funkce a optimalizační algoritmus ICA

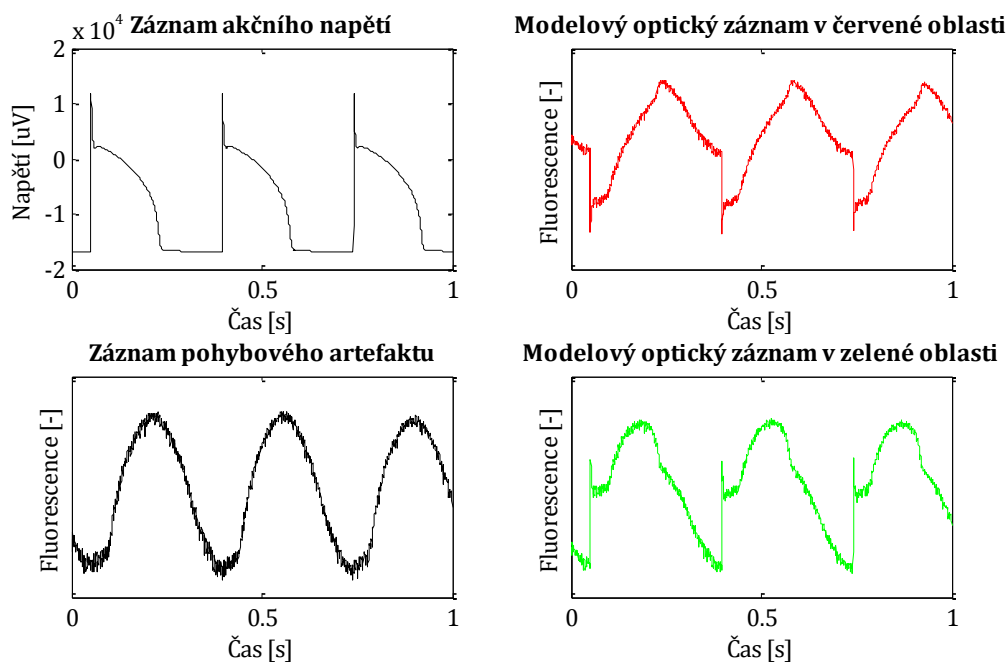
Empirický výběr nejvhodnější varianty ICA byl proveden na základě celkové schopnosti ICA varianty korektně separovat komponenty.

Každý ICA algoritmus se skládá z účelové funkce a z optimalizačního algoritmu hledajícího globální extrém této funkce. Volba účelové funkce ovlivňuje statistické vlastnosti (konzistence, robustnost, atd.) a volba optimalizačního algoritmu ovlivňuje algoritmické vlastnosti (paměťové nároky, výpočetní čas, rychlost konvergence, numerická stabilita, možnost paralelizace procesů, atd.). V ideálním případě je účelová funkce nezávislá na optimalizačním algoritmu. V takové situaci lze účelovou funkci vybrat na základě charakteristik AN a PA, a optimalizační algoritmus na základě hardwarových možností počítače. V praxi však bývá účelová funkce s optimalizačním algoritmem provázána. Důvodem provázání účelové funkce a optimalizačního algoritmu je snaha snížit výpočetní náročnost ICA varianty. Ta je dosahována redukcí opakujících se výpočtů.

Pro účely srovnání ICA variant byl vytvořen modelový průběh AN, a bylo vybráno deset typických reprezentantů PA. Konstrukce modelového průběhu AN byla popsána a zdůvodněna v kapitole 12.2.1, záznam a výběr reprezentantů PA byl popsán v kapitole 12.2.2.

14.2 Výsledky separace pro modelová data

Pro srovnání jednotlivých variant ICA bylo vytvořeno 10 simulovaných optických signálů. Každý simulovaný signál se skládal z dvojice průběhů, které vznikly přičtením, resp. odečtením, záznamu PA k simulovanému průběhu AN. Situaci pro první dvojici ilustruje obrázek (Obrázek 14.1). Tento způsob smísení odpovídá reálné situaci, kdy spektrální posuv emisního světla di-4-ANEPPS v červené oblasti spektra způsobí pokles zaznamenávané intenzity emisního světla, zatímco v zelené oblasti způsobí jeho přírůstek. Na rozdíl od reálné situace jsou signály AN a PA dopředu známé, a proces smísení je lineární a nepřidává do výsledných signálů šum.



Obrázek 14.1: Vznik modelových optických signálů: vlevo - průběhy AN a PA, vpravo - modelové optické signály vzniklé kombinací AN a PA z levé části obrázku.

Schopnost separovat z uměle smísených signálů původní komponenty AN a PA byla ověřena pro 18 variant ICA. Schopnost korektní separace byla testována pro algoritmy AMUSE [77], [85], [86], EVD2 [120], [121], SOBI [89], [78], [84], [90], SOBI-RO [79], [115], SOBI-BPF [112], [113], [114], WASOBI [81], [110], EWASOBI [82], SONS [115], [116], FJADE [107], JADE [107], JADETD [107], QJADE [107], FAJDC4 [107], SAD [107], FPICA [122], [123], [124], POWERICA [125], [126], [127], EFICA [128], [129], COMBI A MULCOMBI [130]. Srovnání bylo provedeno pro stejnou skupinu simulovaných optických signálů.

Každá varianta ICA byla testována pro všech 10 dvojic uměle smísených signálů. Pro ověření ICA variant bylo použito rozšíření programového nástroje Matlab označené zkratkou ICALAB [107]. ICALAB obsahuje varianty ICA, které lze rozdělit do čtyř skupin: (a) algoritmy využívající časovou strukturu komponent vyjádřenou statistikou maximálně druhého řádu, (b) algoritmy využívající časovou strukturu komponent vyjádřenou statistikou více než druhého řádu, (c) algoritmy nevyužívající časovou strukturu, ale využívající statistiku vyššího než druhého řádu, a (d) algoritmy využívající pro separaci vzorový průběh některé z komponent. Schopnost korektní separace byla testována pro první tři skupiny; čtvrtá skupina, vyžadující apriorní znalost průběhu některé komponenty je pro účely separace AN a PA nepoužitelná, protože ani jeden z těchto průběhů není dopředu znám.

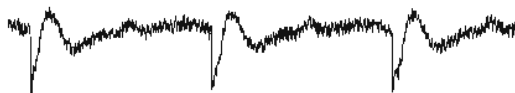
Výsledky separace uměle smíšeného signálu jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 14.1). Jednotlivé varianty ICA jsou uvedeny v levém sloupci tabulky. Výsledky v tabulce mohou nabývat tří hodnot:

- A = (ano), separace je naprosto přesná a tvar odhadnutého AN věrně odráží tvar originálního AN. Pohybový artefakt byl zcela potlačen. Takto odhadnutý AN umožňuje následnou analýzu parametrů AN. Přesnou separaci ilustruje obrázek (Obrázek 14.2).



Obrázek 14.2: Tvar správně odhadnutého průběhu akčního napětí.

- N = (ne), separace selhává, tvar AN je zcela deformovaný a PA nebyl odstraněn. Data zůstávají znehodnocená vlivem pohybu. Zcela selhávající separaci ilustruje obrázek (Obrázek 14.3).



Obrázek 14.3: Tvar nesprávně odhadnutého průběhu akčního napětí.

- V = (s výhradami), separace sice částečně potlačila PA a výsledek separace má větší diagnostickou výtěžnost než samotný smíšený signál, ale tvar odhadnutého AN není zcela věrný originálu. Je možné hodnotit pouze některé parametry AP. Částečně úspěšnou separaci ilustruje obrázek (Obrázek 14.4).



Obrázek 14.4: Tvar částečně správně odhadnutého průběhu akčního napětí.

Z empirického srovnání ICA variant plyne, že nejvhodnější variantou pro separaci AN a PA je varianta WASOBI a její numericky optimalizovaná modifikace EWASOBI. WASOBI a EWASOBI dokázala korektně separovat průběhy AN a PA pro všech deset simulovaných optických signálů.

Ukázka výsledku WASOBI pro jednu z dvojic simulovaného optického signálu je na obrázku (Obrázek 14.5). Z obrázku je vidět, že původní komponenty, AN a PA, jsou tvarově shodné s komponentami separovanými pomocí WASOBI. Liší se pouze svou energií (ta není na obrázku vyjádřena) a znaménkem. Absence energie a znaménka v separovaných komponentách je vlastností ICA, jenž je diskutována v podkapitolách 16.6.1 a 16.6.2.

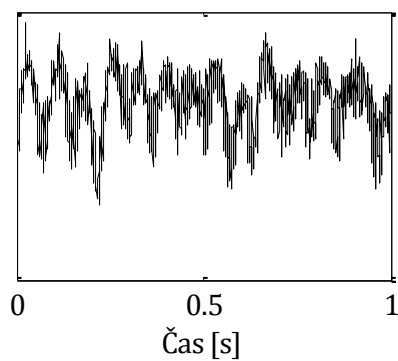
Tabulka 14.1: Výsledky separace uměle smíšeného signálu. Šedou barvou jsou zvýrazněny varianty ICA, které korektně separovaly komponenty ve všech deseti případech.

ICA VARIANTA	ZKOUMANÝ VZOREK									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AMUSE	N	N	N	A	A	N	N	N	A	N
EVD2	N	N	N	A	A	N	N	N	N	N
SOBI	N	N	N	A	A	N	V	N	N	N
SOBI-RO	N	N	N	V	A	N	N	N	N	N
SOBI-BPF	A	V	N	A	A	N	A	A	A	A
WASOBI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
EWASOBI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
SONS	N	N	N	V	A	N	N	N	N	N
FJADE	V	N	N	N	N	N	A	A	N	A
JADE	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N
JADETD	N	N	N	V	A	N	N	N	N	A
QJADE	A	N	N	N	A	N	A	A	V	N
FAJDC4	A	N	N	V	A	N	A	A	N	N
SAD	N	N	N	V	A	N	N	N	N	A
FPICA	V	N	A	A	A	A	N	A	N	N
POWERICA	N	N	N	N	V	N	N	N	N	N
EFICA	N	N	V	N	A	N	A	N	A	A
COMBI A MULCOMBI	N	N	-	-	A	N	A	N	N	N

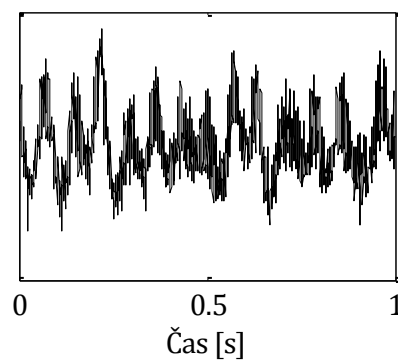
Z hlediska výpočetní náročnosti optimalizačního algoritmu je WASOBI srovnatelná s ostatními ICA variantami. V případě zpracování optických signálů $R(t)$ a $G(t)$ je počet separovaných komponent nízký (jsou jen dvě, AN a PA) a proto jsou nároky použité výpočetní techniky pro všechny varianty obdobné. To samé platí o času, potřebném pro běh algoritmu. Použitou výpočetní technikou (Intel Core2 Quad, 2,5 GHz, 4GB RAM) bylo možno separovat $AN(t)$ a $PA(t)$ během několika sekund pro libovolnou použitou variantu ICA.

WASOBI je nejvhodnější variantou jak z teoretického hlediska, tak z empirického srovnání ICA algoritmů. Pro separaci AN a PA byla proto zvolena varianta WASOBI.

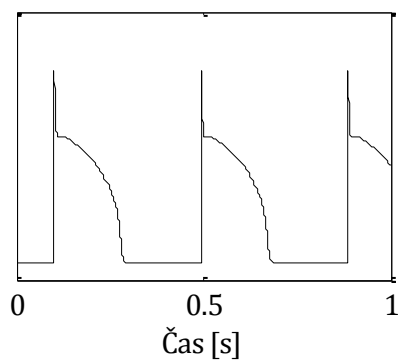
Záznam pohybového artefaktu



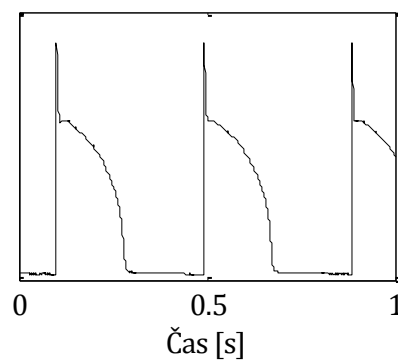
První separovaná komponenta



Modelovaný průběh akčního napětí



Druhá separovaná komponenta



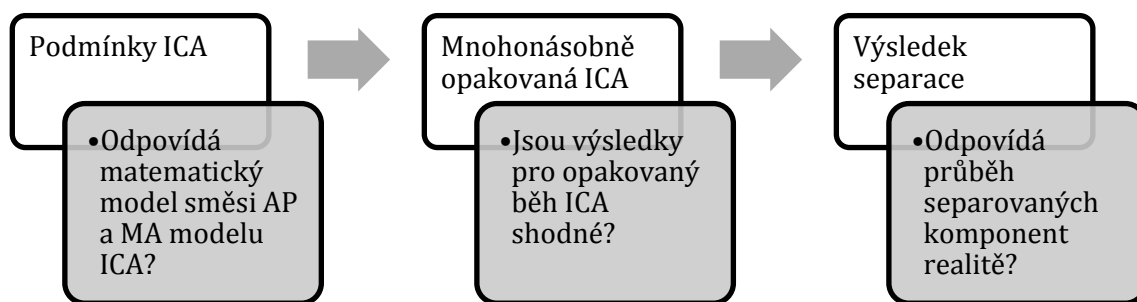
Obrázek 14.5: Vlevo - původní komponenty, vlevo; vpravo - komponenty separované pomocí WASOBI.

15 OVĚŘENÍ KOREKTNOSTI SEPARACE

ICA separuje stochastická data, proto je ověření korektnosti separace algoritmu WASOBI provedeno dvěma způsoby:

- ověřením konzistence výsledků při opakovaném použití ICA (kapitola 15.1)
- srovnáním průběhů separovaných komponent s průběhy získanými poměrovou metodou (kapitola 15.2)

Spolu s ověřením statistické nezávislosti vstupních komponent (kapitola 12.2.3.) je tak schopnost korektní separace metody WASOBI zkoumána ve třech na sobě nezávislých oblastech. Tři oblasti znázorňuje schéma na obrázku (Obrázek 15.1).



Obrázek 15.1: Oblasti ověření korektní separace komponent.

15.1 První způsob ověření výsledků ICA: mnohonásobně opakovaná ICA

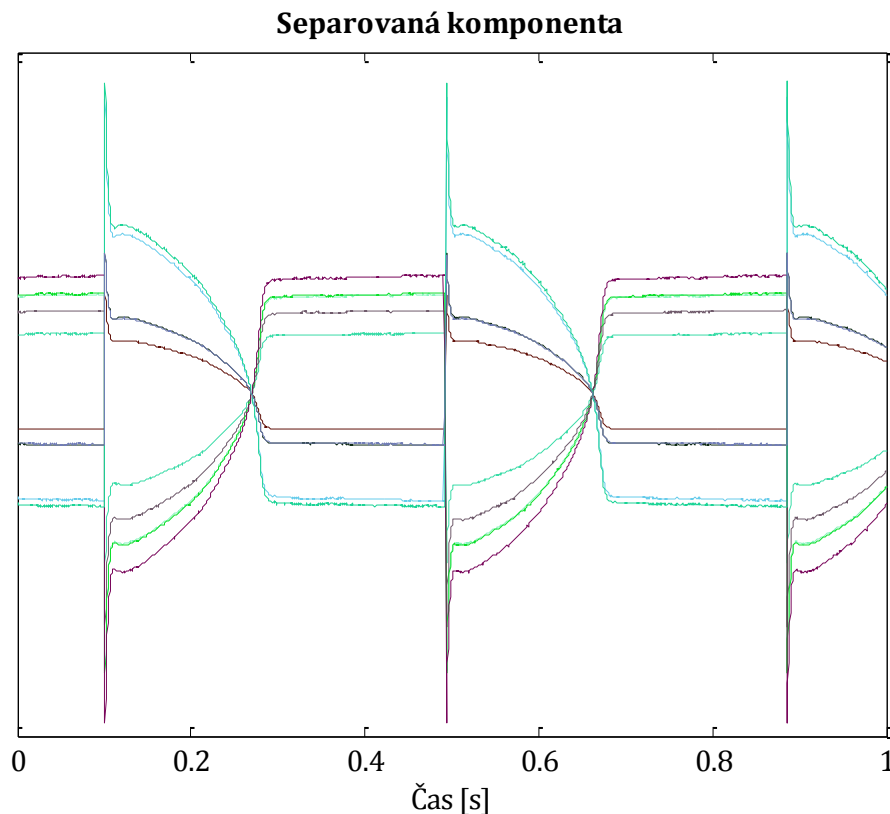
Ověření ICA jako metody zpracovávající stochastická data vyžaduje několikanásobné opakování jejího běhu. Výsledky jednotlivých opakování ICA pro stejná vstupní data by měly být co nejvíce soběpodobné (až na energii signálu a znaménko). Metoda WASOBI skutečně separuje AN pokaždé soběpodobně, což lze vidět z příkladu na obrázku (Obrázek 15.2). Zobrazené průběhy se liší pouze svou orientací a energií, vyjádřenou velikostí výchylky.

Opakovaný běh WASOBI pro stejná vstupní data umožňuje vyhodnotit vnitřní odolnost algoritmu proti odchylkám způsobených numerickým výpočtem extrémů účelové funkce. Nevyjadřuje však správnost výsledku, tj. neověřuje, zda má průběh separované komponenty AN očekávaný tvar.

Ověření korektnosti separace a současně ověření schopnosti metody WASOBI tohoto výsledku opakovaně dosáhnout bylo provedeno Monte Carlo analýzou. Monte Carlo analýzou bylo vyhodnoceno deset uměle smísených signálů. Každý signál byl tvořen směsí jednoho ze zaznamenaných PA a modelového AN. Mixážní matice byla pokaždé sestavena tak, aby obsahovala náhodně generované prvky, a byla nesusingularní. Toto nastavení mixážní matice odpovídá reálnému prostředí. Monte Carlo analýza byla spouštěna pokaždé pro 100 běhů metody WASOBI.

Monte Carlo analýza byla provedena pro dva kvantifikátory korektnosti separace. Prvním byl poměr užitečného signálu k interferenci (SIR, z anglického signal

to interference ratio) definovaný pro separované komponenty a druhým byl SIR definovaný pro mixážní matici. Oba vyjadřují korektnost separace, ale SIR pro mixážní matici se vztahuje k procesu separace, zatímco SIR pro komponenty se vztahuje k výsledným komponentám.



Obrázek 15.2: Deset výsledků opakovaného běhu WASOBI pro stejná vstupní data. Každý separovaný průběh AN je zobrazen odlišnou barvou.

15.1.1 Monte Carlo analýza pro SIR definovaný pomocí zdrojového signálu a separované komponenty.

Kvalita separace AN a PA metodou WASOBI byla posouzena srovnáním průběhu původní a separované komponenty. Úspěšnost separace byla kvantifikována poměrem přeslechu k užitečnému signálu (SIRS) [131]. SIRS vyjádřený pomocí původní a separované komponenty je definovaný vztahem:

$$SIR_S = -10 \log_{10} \left(\frac{\|\mathbf{y} - \mathbf{s}\|^2}{\|\mathbf{s}\|^2} \right) \quad 15.1$$

kde \mathbf{y} je komponenta separovaná metodou WASOBI a \mathbf{s} je originální komponenta, která je předem známá (AN, nebo PA). Úspěšnost separace je dána kvůli separaci dvou komponent AN a PA průměrnou hodnotou SIR_S . Hodnota SIR_S vychází ze separovaných komponent, a proto je vhodná i pro ověřování korektnosti WASOBI algoritmu pro signály uměle zarušené šumem.

15.1.2 Monte Carlo analýza pro SIR definovaný pomocí mixážní a separační matice

Poměr SIR definovaný pomocí mixážní a separační matice (zkráceně SIR_A) vyjadřuje míru přiblížení odhadu separační matice k inverzi předem známé mixážní matice. V ideálním případě by odhadnutá separační matice měla být přesně rovna inverzní mixážní matici. V ilustračním případě odhadu jediné komponenty \mathbf{y} je tato komponenta rovna násobku separační matice \mathbf{W} se smíšeným signálem \mathbf{x} :

$$\mathbf{y} = \mathbf{W}^T \mathbf{x} \quad 15.2$$

kde \mathbf{y} je separovaná komponenta, \mathbf{W} je separační matice, a \mathbf{x} je smíšený signál.

Smíšený signál \mathbf{x} je kombinací původního zdrojového signálu \mathbf{s} s mixážní maticí \mathbf{A} :

$$\mathbf{W}^T \mathbf{x} = (\mathbf{W}^T \mathbf{A}) \mathbf{s} \quad 15.3$$

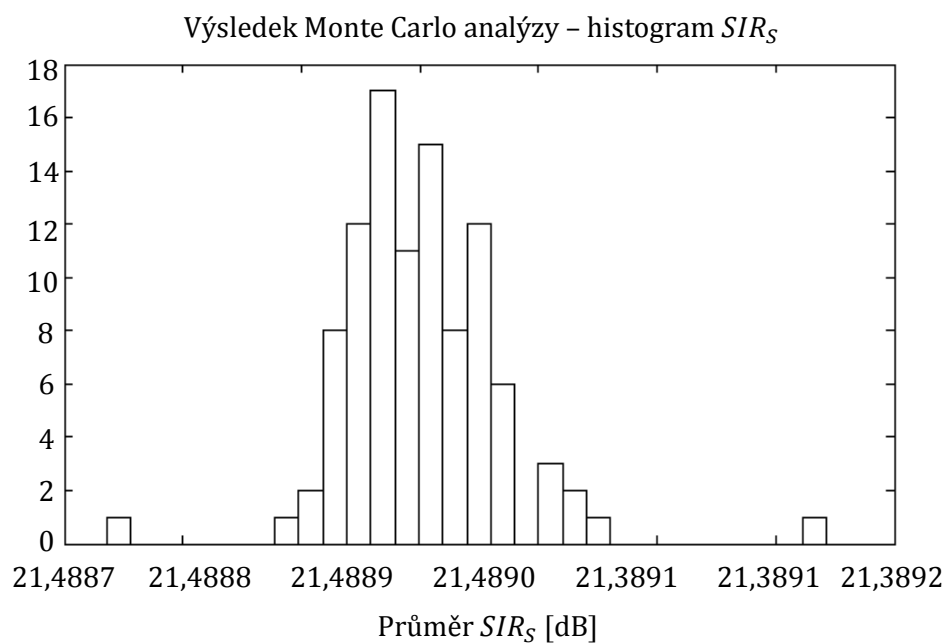
kde \mathbf{W} je separační matice, \mathbf{x} je smíšený signál, \mathbf{A} je mixážní matice, a \mathbf{s} je původní komponenta.

Maticový součin separační a mixážní matice, tedy $\mathbf{W}^T \mathbf{A}$, lze označit jako \mathbf{G} , převést ho z maticového do vektorového tvaru, normalizovat ho vydělením každého jeho prvku jejich součtem, a označit ho \mathbf{g} . V případě přesné separace by ideální normalizovaný vektor \mathbf{g} měl být roven jednotkovému vektoru $\mathbf{u} = [0 \ 0 \ \dots \ 1 \ \dots \ 0]$. Rozdílem mezi normalizovaným vektorem \mathbf{g} a jednotkovým vektorem \mathbf{u} proto lze hodnotit efektivitu WASOBI, což dává vzniknout vztahu:

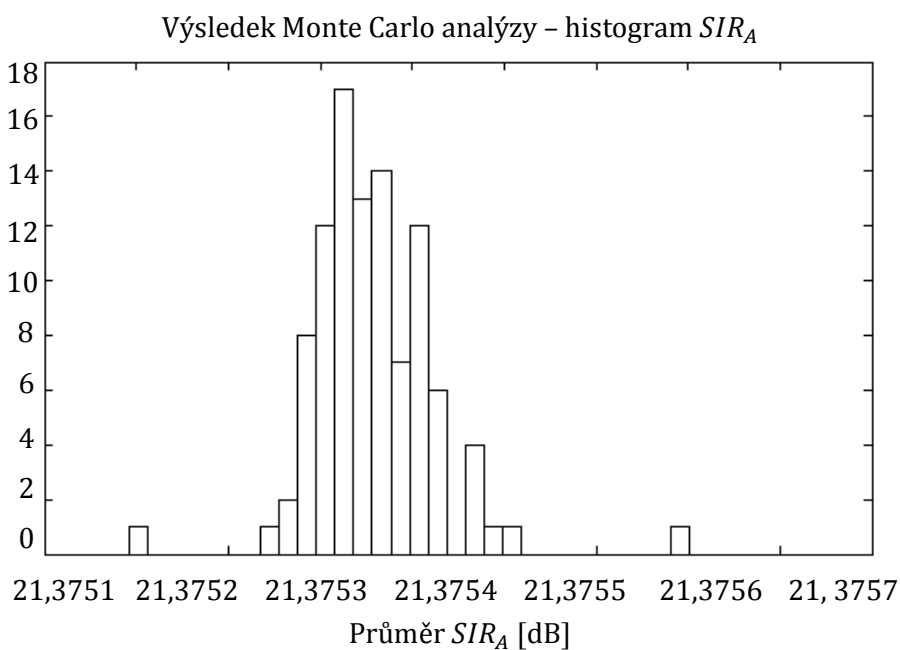
$$SIR_A = -10 \log_{10}(\|\mathbf{g} - \mathbf{u}\|^2) \quad 15.4$$

kde SIR_A je poměr SIR definovaný pomocí mixážní a separační matice, \mathbf{g} je normalizovaný vektor vzniklý ze součinu mixážní a separační matice, a \mathbf{u} je jednotkový vektor. V případě separace více komponent lze jako míru úspěšnosti separace použít průměr příslušných SIR_A , stejně jako tomu bylo u SIR_S .

Výsledky Monte Carlo analýzy pro první kombinaci AN a PA jsou zobrazeny na obrázcích (Obrázek 15.3) a (Obrázek 15.4). Obrázek (Obrázek 15.3) zobrazuje histogram SIR_S , obrázek (Obrázek 15.4) zobrazuje histogram SIR_A .



Obrázek 15.3: Výsledek Monte Carlo analýzy pro první směs průběhů akčního napětí a pohybového artefaktu pro parametr SIR získaný ze separovaných zdrojů.



Obrázek 15.4: Výsledek Monte Carlo analýzy pro první směs průběhů akčního napětí a pohybového artefaktu pro parametr SIR získaný ze separační matice.

Střední hodnoty a směrodatné odchylky pro SIR_S jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 15.1). ICA je považována za efektivní a konzistentní, jsou-li splněny pro střední hodnotu SIR_S dvě podmínky [76]:

$$\bar{x}(SIR_S) > 16dB \quad 15.5$$

$$\sigma(SIR_S) < \pm \frac{\bar{x}(SIR_S)}{10} \% \quad 15.6$$

kde $\bar{x}(SIR_S)$ označuje průměrnou hodnotu SIR_S a $\sigma(SIR_S)$ jeho směrodatnou odchylku.

Obě podmínky splňují všechny řádky v tabulce (Tabulka 15.1), proto lze uzavřít, že metoda WASOBI funguje velmi dobře pro všechny zkoumané typy kombinací AN s AP.

Tabulka 15.1: Hodnoty SIRS.

Číslo kombinace AN a PA	Průměrná hodnota SIRS (dB)	Směrodatná odchylka SIRS (%)
1	21,48	$6,13 \cdot 10^{-7}$
2	30,34	$1,96 \cdot 10^{-6}$
3	48,23	$3,46 \cdot 10^{-5}$
4	39,63	$1,57 \cdot 10^{-6}$
5	50,48	$5,63 \cdot 10^{-7}$
6	37,48	$4,57 \cdot 10^{-4}$
7	29,39	$9,46 \cdot 10^{-8}$
8	27,44	$5,30 \cdot 10^{-5}$
9	32,12	$4,48 \cdot 10^{-7}$
10	29,18	$9,72 \cdot 10^{-8}$

Podobné závěry plynou i z tabulky (Tabulka 15.2), která shrnuje střední hodnoty a směrodatné odchylky parametru SIR_A , a definuje tak efektivitu a konzistenci metody WASOBI z pohledu odhadnuté separační matice A. Opět platí podmínky 15.5 a 15.6, udávající, že úspěšná separace má střední hodnoty SIR_A vyšší než 16dB a směrodatnou odchylku menší než 10%.

Tabulka 15.2: Hodnoty SIRA.

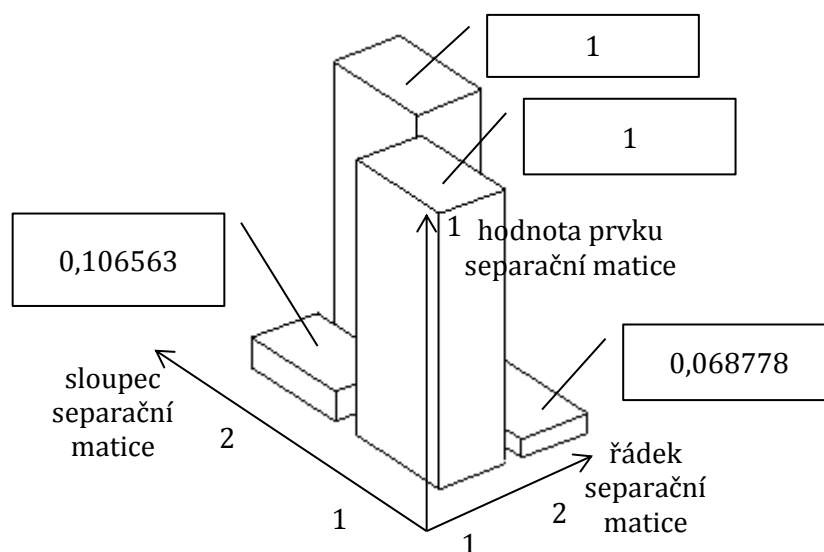
Číslo kombinace AN a PA	Průměrná hodnota SIRA (dB)	Směrodatná odchylka SIRA (%)
1	21,38	$6,10 \cdot 10^{-7}$
2	29,62	$1,89 \cdot 10^{-6}$
3	45,39	$9,48 \cdot 10^{-5}$
4	39,53	$1,56 \cdot 10^{-6}$
5	50,43	$5,62 \cdot 10^{-8}$
6	35,47	$4,32 \cdot 10^{-6}$
7	29,29	$9,46 \cdot 10^{-8}$
8	27,35	$5,36 \cdot 10^{-5}$
9	31,73	$4,50 \cdot 10^{-7}$
10	28,8	$7,06 \cdot 10^{-8}$

15.1.3 Index separability

Korektnost separace byla dále kvantifikována indexem separability. Index separability určuje kvalitu separace srovnáním známé mixážní matice \mathbf{A} a odhadnuté separační matice \mathbf{W} . Je vypočítán z prvků matice $\mathbf{G} = \mathbf{WA}$, určující zkreslení dané procesem umělého smísení signálů s následnou opětovnou separací. [132], [133], [134], [135], [136]. Index separability je definován vztahem:

$$PI(\mathbf{G}) = \frac{1}{m(n-1)} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \left(\frac{[G]_{i,j}}{\max_j [G]_{i,j}} - 1 \right) \quad 15.7$$

Kde PI je index separability, m, n jsou rozměry dvojdimenzionální matice \mathbf{G} a $G_{i,j}$ jsou její prvky. Vzorec vychází z myšlenky, že pro ideální odhad by měla být matice \mathbf{G} tvořena pouze prvky na diagonále. Reálný odhad matice \mathbf{G} pro jeden z deseti uměle smísených signálů je zobrazen na obrázku (Obrázek 15.5).



Obrázek 15.5: Diagonalita odhadnuté matice G.

Index separability pro metodu WASOBI je uveden v tabulce (Tabulka 15.3). Parametry mixážní matice a Monte Carlo analýzy zůstaly stejné jako u SIR_S a SIR_A . Pro ideálně odhadnutou separační matici by měl být index separace rovný nule. Hodnoty indexu separace v tabulce (Tabulka 15.3) se k nule blíží, což indikuje správný odhad separační matice.

Tabulka 15.3: Index separace metody WASOBI pro deset kombinací AN a PA.

Číslo kombinace AN a PA	Index separability [-]
1	0,08
2	0,05
3	0,01
4	0,02
5	0,01
6	0,02
7	0,04
8	0,04
9	0,02
10	0,03

Všechny tři kvantifikátory korektnosti separace - SIR_S , SIR_A , a index separability - ukazují, že WASOBI dokáže separovat záznamy AN a PA velmi dobře. Tím je dokázána použitelnost metody WASOBI pro separaci AN z optických záznamů zarušených pohybovým artefaktem.

15.1.4 Separace ve zvlášť nepříznivých podmínkách

Přesnost separace může být ve velmi vyjimečných případech snížena selháním numerického výpočtu [107]. Výsledek separace je totiž kromě vlastností samotné účelové funkce závislý na numerických vlastnostech algoritmu použitého pro hledání jejího extrému. Při použití numerických metod může dojít k výskytu zaokrouhlovací chyby. Z toho důvodu byla Monte Carlo analýzou vyhodnocena úspěšnost separace metody WASOBI v podmínkách ovlivněných zaokrouhlovací chybou (poznámka 1). Podmínky pro vznik zaokrouhlovací chyby byly nastaveny použitím špatně podmíněné mixážní matice, s číslem podmíněnosti úlohy větším než 10000. Monte Carlo analýza byla opět provedena pro sto běhů WASOBI. Vstupní signály i hodnotící parametry zůstaly stejné jako v případě analýzy WASOBI v normálních podmínkách.

Střední hodnoty SIR_S (viz Tabulka 15.4) pro každou testovanou kombinaci AN a PA byly vyšší než požadovaných 16dB, což je indikátor velmi dobré efektivity metody WASOBI pro separaci AN a PA. Zato hodnoty směrodatné odchylky ve třech případech (12%, 13% a 14%) mírně překročily doporučenou hodnotu $\pm 10\%$, což indikuje sníženou konzistenci výsledků metody WASOBI.

Tabulka 15.4: Střední hodnoty SIR_S a jejich směrodatné odchylky.

Číslo kombinace AN a PA	Střední hodnota SIR_S (dB)	Směrodatná odchylka SIR_S (%)
1	21,42	6,01
2	29,69	14,67
3	47,58	10,66
4	39,49	4,59
5	50,43	3,27
6	37,05	13,53
7	28,79	14,99
8	27,56	6,15
9	32,18	1,35
10	29,29	2,77

Poznámka 1: Zaokrouhlovací chyba může vést v případě špatně podmíněné úlohy k výraznému zkreslení výsledku. Příkladem je srovnání dvou soustav rovnic. Soustava rovnic vlevo má řešení $x = 2$, $y = 0$, zatímco soustava rovnic vpravo má řešení $x = 1$, $y = 1$.

$$x + y = 2$$

$$x + 1,001y = 2$$

$$x + y = 2$$

$$x + 1,001y = 2,001$$

Malá změna konstanty tak vede k odlišnému výsledku. Tento stav je nazýván špatně podmíněná úloha.

Obdobné závěry plynou z analýzy hodnot SIR_A (viz Tabulka 15.5) pro každou testovanou kombinaci AN a PA, kde střední hodnoty SIR_A byly vyšší než požadovaných 16dB, ale hodnoty směrodatné odchylky ve třech případech (13%, 14% a 14%) opět mírně překročily doporučenou hodnotu $\pm 10\%$.

Tabulka 15.5: Střední hodnoty SIR_A a jejich směrodatné odchylky.

Číslo kombinace AN a PA	Střední hodnota SIR_A (dB)	Směrodatná odchylka SIR_A (%)
1	21,29	5,60
2	28,90	12,65
3	44,73	9,82
4	39,40	4,56
5	50,39	3,26
6	35,04	12,63
7	28,61	13,44
8	27,16	6,02
9	31,79	1,34
10	28,90	2,73

Index separability (viz Tabulka 15.6) se pro Monte Carlo analýzu se pro normální a špatně podmíněnou mixážní matici prakticky neliší, rozdíl je pouze v desítitisícinách. Podle indexu separability tedy nepředstavuje ojedinělý výskyt zaokrouhlovací chyby žádný problém.

Tabulka 15.6: Index separability metody WASOBI pro deset kombinací AN a PA v případě špatně podmíněné mixážní matice.

Číslo kombinace AN a PA	Index separability
1	0,09
2	0,06
3	0,01
4	0,03
5	0,01
6	0,02
7	0,04
8	0,04
9	0,02
10	0,03

Shrnutím poznatků z Monte Carlo analýzy pro špatně podmíněnou mixážní matici je závěr, že ve zvlášť nepříznivých podmínkách WASOBI ve většině případů separuje AN a PA správně.

Celkový závěr z Monte Carlo analýzy pro WASOBI je potvrzení, že WASOBI je efektivní a spolehlivá metoda pro separaci AN od PA. Všechny tři analyzované

parametry (SIR_A , SIR_s , a index separability) ukazují, že WASOBI umožňuje korektně separovat AN ze zaznamenaných optických signálů. Ve velmi vyjimečných případech může dojít k selhání metody. Pravděpodobnost současného výskytu nepříznivých podmínek a následného selhání je však nepatrná a proto je tento problém pouze teoretickým omezením metody, jenž v praxi nebrání úspěšnému použití metody.

15.2 Druhý způsob ověření výsledků ICA: srovnání ICA a poměrové metody

Druhým způsobem ověření správnosti separace bylo srovnání výsledků metody WASOBI s výsledky poměrové metody. Poměrová metoda, popsaná detailně v kapitole 6, představuje v současnosti pravděpodobně nejlepší metodu pro odstranění PA. Poměrová metoda byla vybrána pro srovnání s metodou WASOBI kvůli tomu, že její matematický aparát umožňuje zdůvodnit korektnost separovaného průběhu AN. Druhým důvodem je celosvětové rozšíření poměrové metody.

Srovnání výsledků obou metod bylo provedeno pro reálná data, jimiž bylo několik desítek opticky zaznamenaných signálů $R(t)$ a $G(t)$. Optické signály jsou záznamem elektrické aktivity srdečních buněk izolovaného srdce v experimentu, během něhož byly opakovaně měněny experimentální podmínky. Signály zahrnují úseky s optimálními fyziologickými podmínkami, v kterých má AN očekávaný tvar a jednotlivé repetice AN se pravidelně opakují, ischemické úseky obsahující arytmie a absence AN na místech, kde by měl být, a úseky následující po návratu do fyziologických podmínek po proběhlé globální ischemii, charakteristické energetickým vyčerpáním srdce a sníženou velikostí AN.

Výsledky poměrové metody a metody WASOBI jsou zobrazeny na obrázku (Obrázek 15.6). V horní části obrázku je zobrazen průběh AN a průběh PA. Průběh AN získaný poměrovou metodou je zobrazen modře a průběh získaný metodou WASOBI červeně. Je vidět, že oba průběhy se od sebe prakticky neliší. Metoda WASOBI je proto srovnatelná s poměrovou metodou, a představuje její vhodnou alternativu.

Kromě dobře viditelného AN je v signálech získaných oběma metodami vidět zbytkový artefakt. Ten vzniká nedokonalostí konstrukčního řešení záznamové aparatury a jako takový nelze odstranit ani jednou ze srovnávaných metod. Nepředstavuje však chybu metody (ať už jde o WASOBI, či poměrovou metodu), nýbrž o konstrukční nedostatek a v případě použití lepšího konstrukčního řešení detektoru je očekáváno jeho vymizení. Tato hypotéza je podložena výše uvedeným ověřením metody WASOBI, během nichž při umělém smísení AN a PA a následné opětovné separaci výsledný průběh AN žádné zbytkové artefakty neobsahoval.

Na obrázku (Obrázek 15.6) je postupně vykreslen výsledek poměrové metody s výsledkem ICA, záznam elektrogramu, simultánně zaznamenaném s AN, a optické signály snímané v červené a v zelené oblasti spektra. Z obrázku (Obrázek 15.6) je patrné, že WASOBI i poměrová metoda dokáží AN v zaznamenaných optických signálech dobře identifikovat.

V nižší prostřední části obrázku (Obrázek 15.6) je zobrazen optický záznam směsi AN a PA snímaný v červené spektrální oblasti a v spodní části obrázku (Obrázek 15.6) je zobrazen stejný signál snímaný v zelené spektrální oblasti. V obou optických

signálech je AN špatně pozorovatelný.

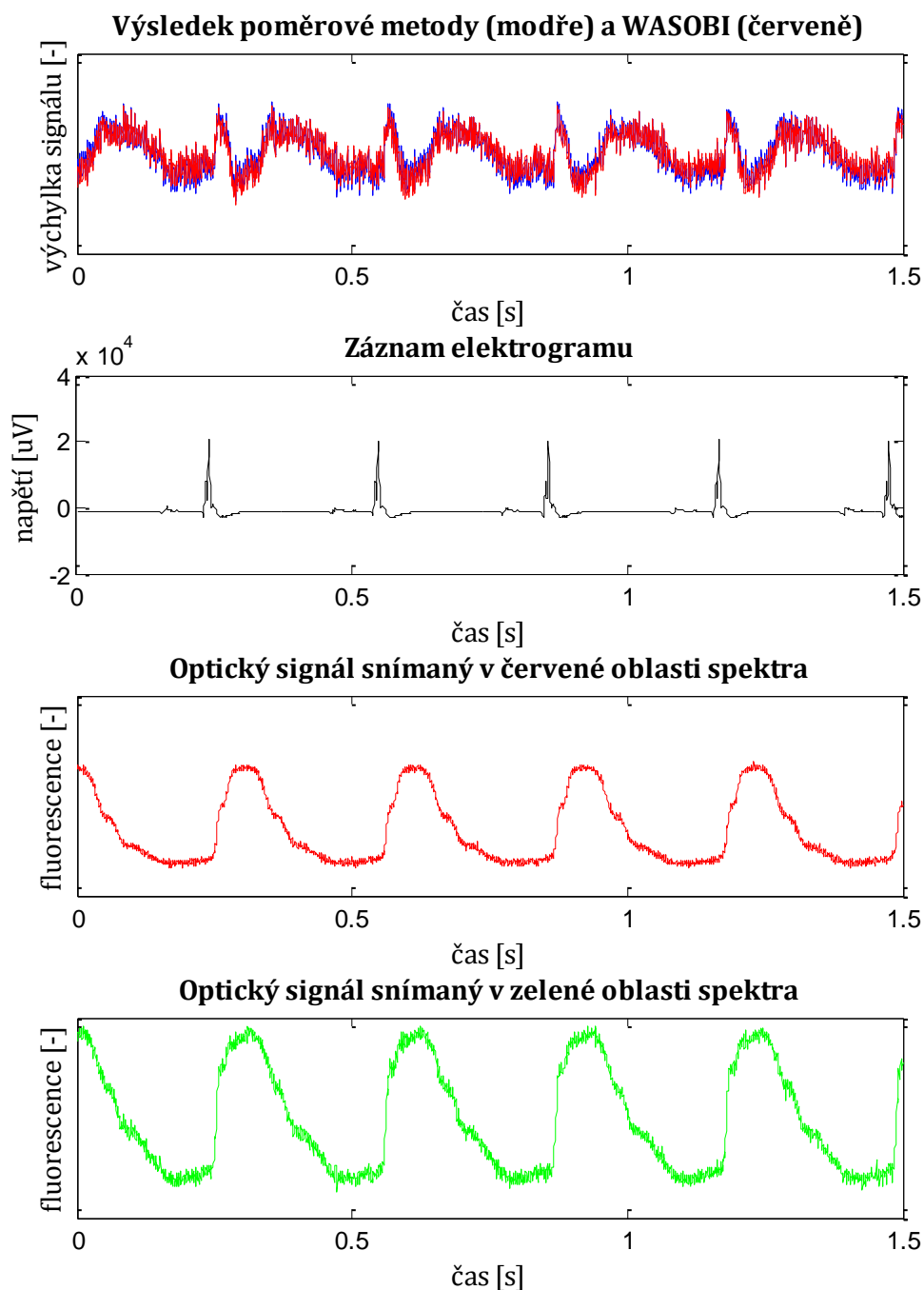
Metoda WASOBI je použitelná i pro signály zaznamenané v ischemických fázích experimentů, které mohou obsahovat arytmie. Schopnost metody WASOBI separovat AN a PA byla testována na signálu obsahujícím arytmie. Opět se ukázalo, že metoda WASOBI je srovnatelná s poměrovou metodou, viz obrázek (Obrázek 15.7).

V horní části obrázku (Obrázek 15.7) je červeně zobrazen průběh AN získaný metodou WASOBI a modře průběh poměrovou metodou. Signály jsou shodné, což dokazuje, že metoda WASOBI je s poměrovou metodou srovnatelná i v případě separace signálů obsahujících arytmie. Arytmie signálu jsou patrné ze záznamu elektrogramu, zobrazeného ve vyšší prostřední části obrázku (Obrázek 15.7). Na začátku zobrazeného úseku elektrogramu je patrná absence QRS komplexu v čase přibližně 0,2s. Současně lze pozorovat v horní části obrázku, že ani metoda WASOBI, ani poměrová metoda nedetekovala v tomto okamžiku výskyt AN.

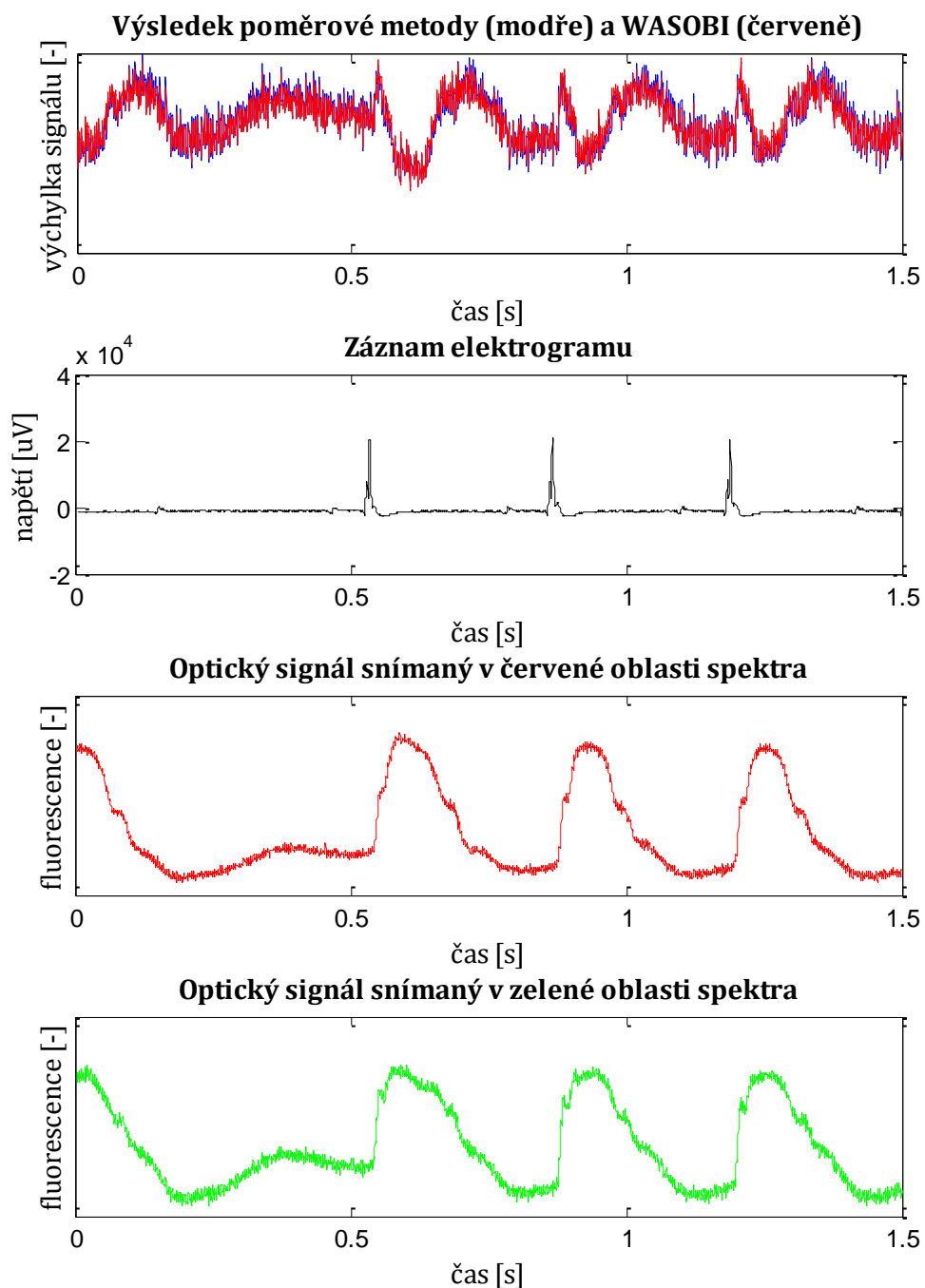
Dolní dvě části obrázku (Obrázek 15.7) zobrazují optický záznam směsi AN a PA snímány v červené spektrální oblasti a stejný signál snímány v zelené spektrální oblasti.

Obrázek (Obrázek 15.8) ukazuje, že metoda WASOBI může být nejen srovnatelná s poměrovou metodou, ale že v některých případech může být i lepší. Pro signály zaznamenané po opakovém ischemickém inzultu dosahuje WASOBI lepších výsledků, než poměrová metoda. Po opakovaném ischemickém inzultu byla snímána intenzita emitovaného světla nižší než v kontrolní fázi experimentu díky energetickému vyčerpání izolovaného srdce, postupné internalizaci barviva v měřené tkáni a díky vlivu fotovysvícení. Na obrázku (Obrázek 15.8) je vidět, že signály získané poměrovou metodou i metodou WASOBI umožňují sledovat průběh AN v depolarizační fázi i ve fázi plató, ale pouze ze signálu získaného WASOBI je možné určit zároveň repolarizace. Proto pouze průběh AN získaný metodou WASOBI umožňuje změřit délku AN, jenž je jedním z jeho nejdůležitějších parametrů [36].

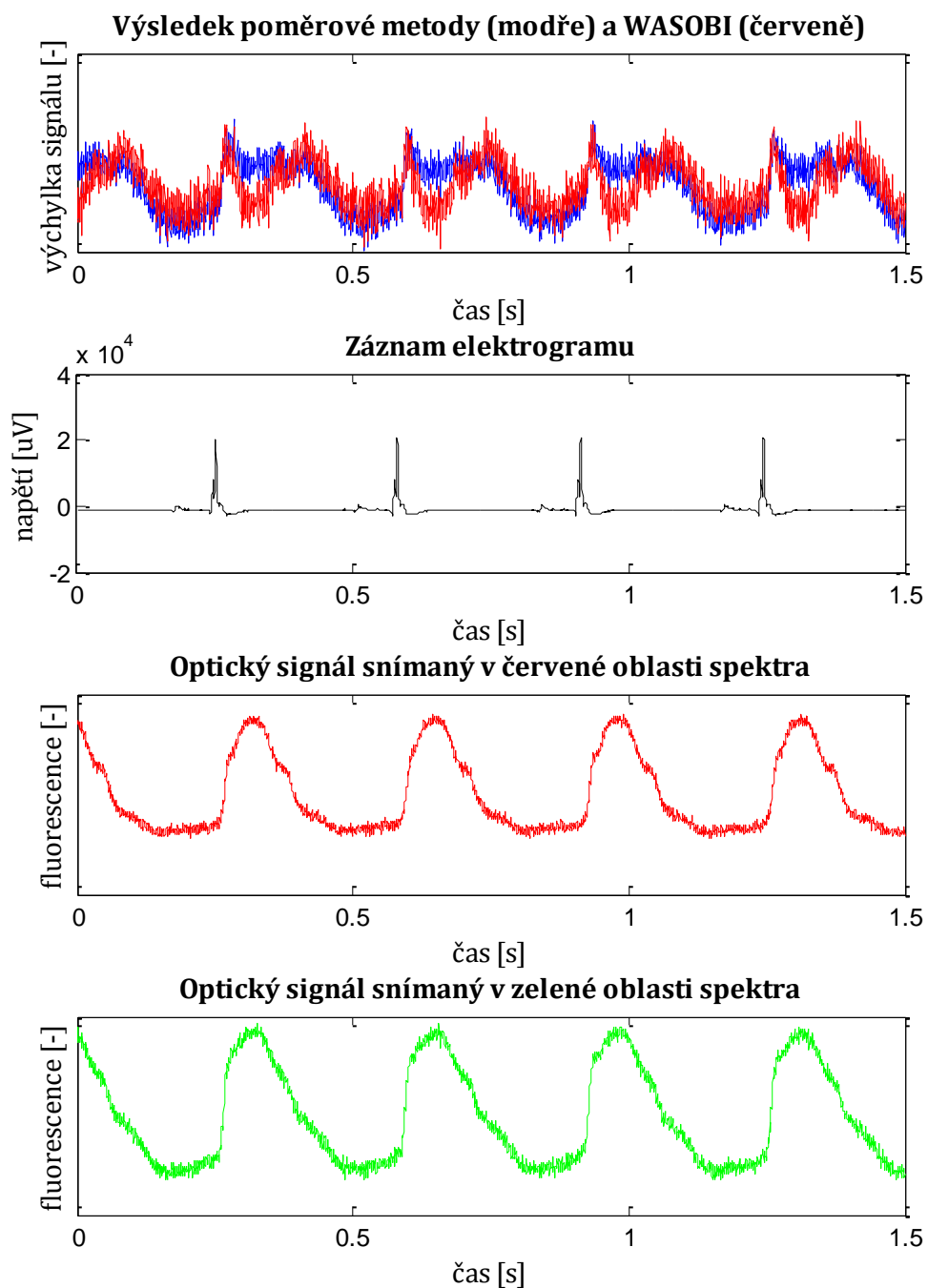
Tato výhoda WASOBI oproti poměrové metodě má jeden praktický důsledek. Schopnost WASOBI potlačit PA i po několikanásobném ischemickém umožňuje vzájemně srovnat elektrickou aktivitu srdce v normálních i změněných experimentálních podmínkách. Toto srovnání je naplní většiny kardiologických studií, takže použití WASOBI vede ve svém důsledku k zvýšení informační výtěžnosti experimentů.



Obrázek 15.6: Srovnání výsledků poměrové metody a metody ICA. Shora dolů: srovnání průběhů akčního napětí získaného pomocí poměrové metody (modře) a pomocí WASOBI (červeně); simultánní záznam elektrogramu; původní optický záznam v červené oblasti spektra; původní optický záznam v zelené oblasti spektra.



Obrázek 15.7: Srovnání výsledků poměrové metody a metody ICA. Shora dolů: srovnání průběhů akčního napětí získaného pomocí poměrové metody (modře) a pomocí WASOBI (červeně); simultánní záznam elektrogramu; původní optický záznam v červené oblasti spektra; původní optický záznam v zelené oblasti spektra.

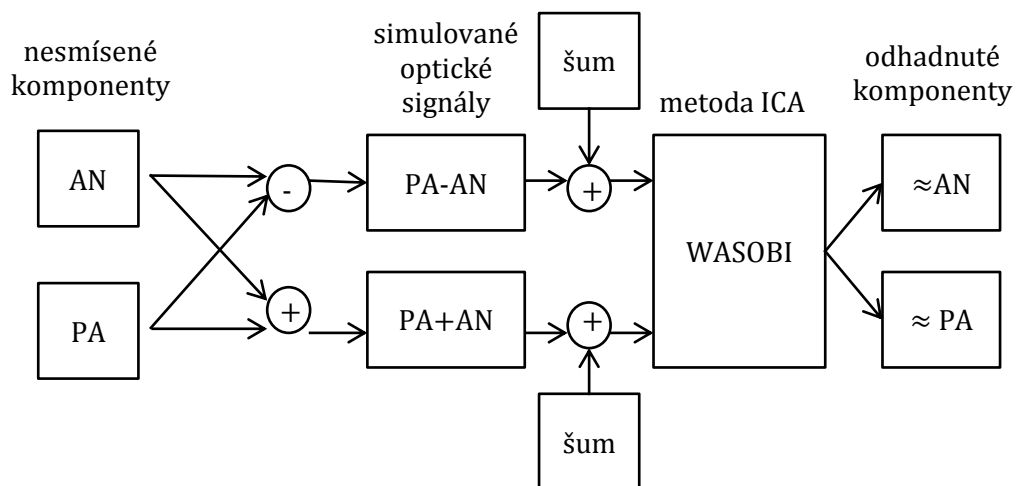


Obrázek 15.8: Srovnání výsledků poměrové metody a ICA. Shora dolů: srovnání průběhů akčního napětí získaného pomocí poměrové metody (modře) a pomocí WASOBI (červeně); simultánní záznam elektrogramu; původní optický záznam v červené oblasti spektra; původní optický záznam v zelené oblasti spektra.

15.3 Vliv šumu na korektnost separace

V minulé kapitole bylo dokázáno, že WASOBI je schopna optimálně separovat AN a PA z optických signálů zaznamenaných třísegmentovou fotodiodou. Pokud by WASOBI byla použita pro data zaznamenaná odlišným záznamovým systémem, mohl by případný nižší poměr SNR signálů zhoršit schopnost separace metodou WASOBI. Proto je v této kapitole studována schopnost separace AN a PA v záznamech s vysokou úrovní šumu.

Vliv šumu byl ověřen na uměle zarušených datech, vytvořených kombinací modelového AN a reálného PA. Vznik umělých signálů zarušených šumem, a jejich opětovné oddělení metodou WASOBI znázorňuje schéma na obrázku (Obrázek 15.9). Levá část obrázku ilustruje vznik dvou umělých signálů, první signál je tvořen rozdílem PA a AN, druhý jejich součtem. Prostřední část obrázku ilustruje přičtení bílého šumu, pravá část separaci metodou WASOBI. Separované komponenty jsou tvarově shodné s původními nesmísenými komponentami.



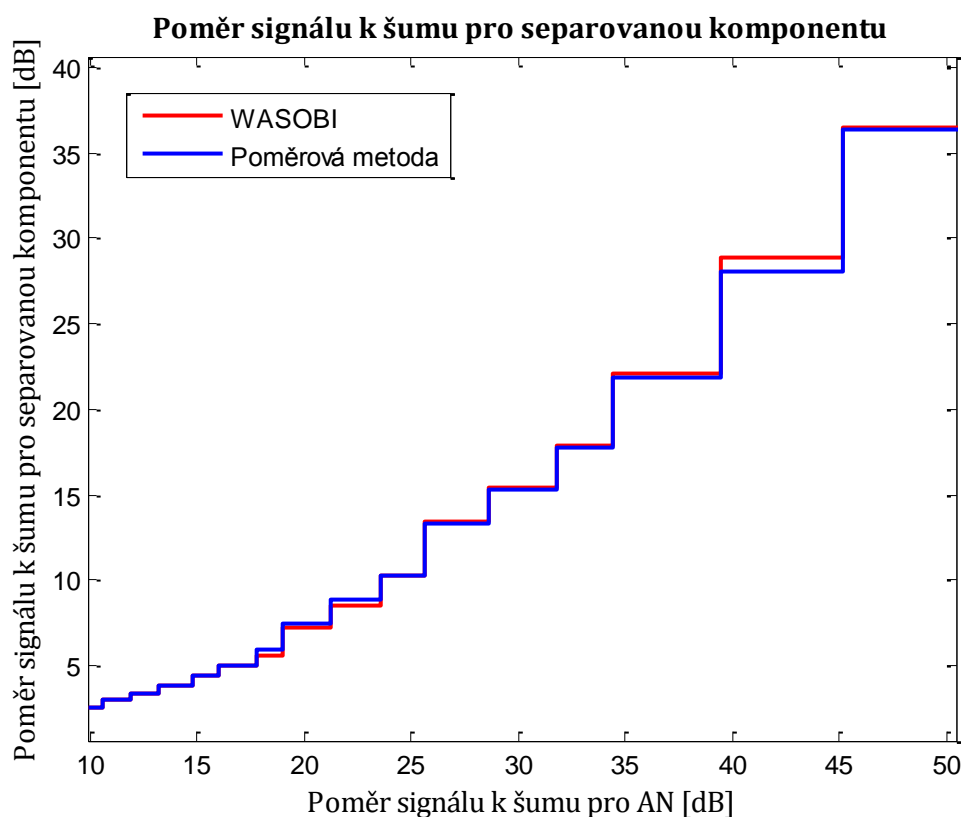
Obrázek 15.9: Schéma výroby umělých optických signálů a jejich opětovné oddělení.

Výsledky separace zašuměných signálů byly srovnány s výsledky poměrové metody. Srovnání SNR průběhu AN získaného pomocí WASOBI a pomocí poměrové metody je zobrazeno na obrázku (Obrázek 15.10). Červenou barvou je zobrazen SNR pro AN separovaný pomocí WASOBI, modrou barvou je zobrazen SNR pro AN získaný poměrovou metodou. Hodnoty SNR pro separovanou komponentu jsou spočítané pomocí vztahu:

$$SNR = 10 \log_{10} \left(\frac{\sum_{n=0}^{N-1} |s(n)|^2}{\sum_{n=0}^{N-1} |s'(n) - s(n)|^2} \right) \quad 15.8$$

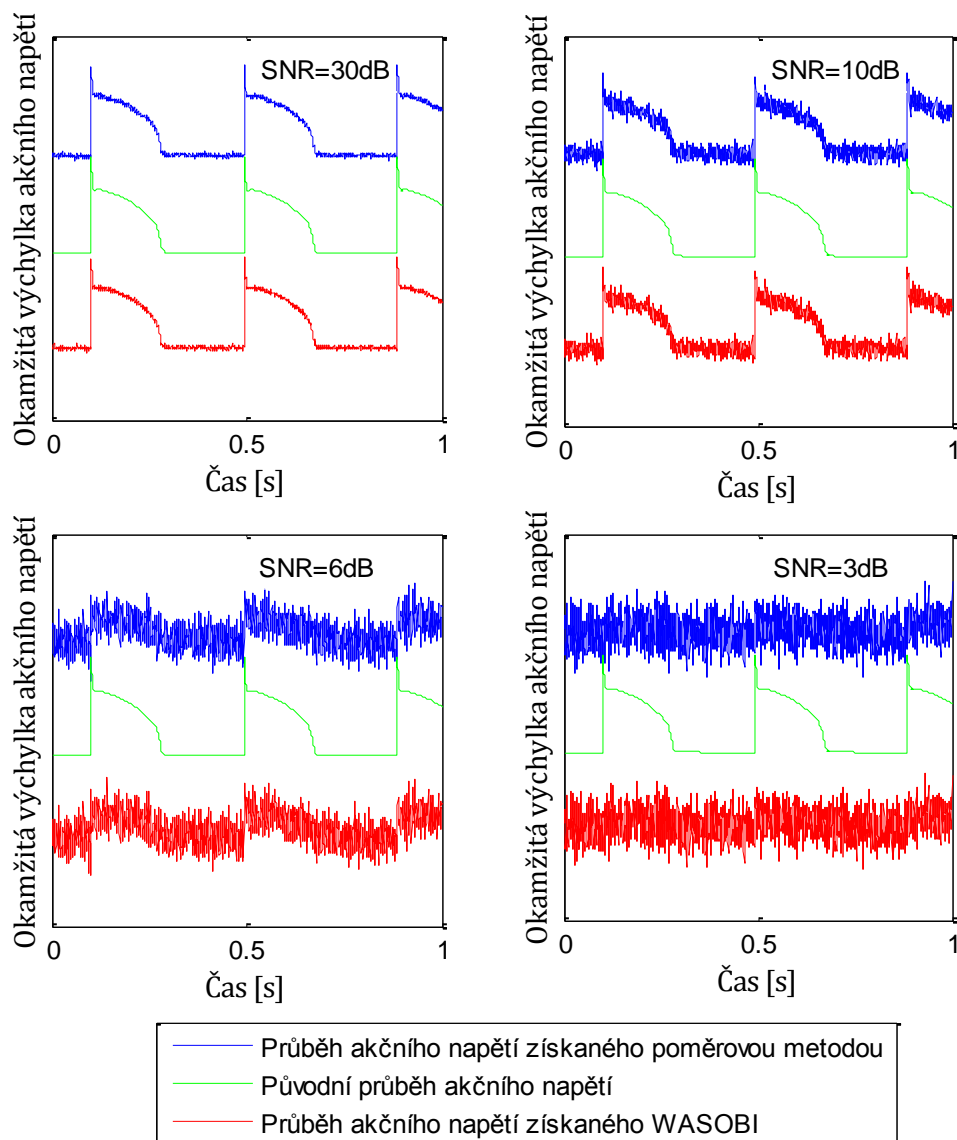
kde $s(n)$ je modelový AN (model Luo-Ruby, viz kapitola 12.2.1) a $s'(n)$ je separovaná komponenta, která odpovídá AN.

Ze srovnání plyne, že metoda WASOBI je ekvivalentní poměrové metodě i v případě významného zašumění vstupních signálů. Pokles SNR při zvyšování šumu vstupních dat je srovnatelný pro obě metody.



Obrázek 15.10: Srovnání poměru signálu k šumu pro průběh AN získaný metodou WASOBI a poměrovou metodou.

Srovnání výsledků WASOBI a poměrové metody při různých úrovních šumu



Obrázek 15.11: Srovnání výsledků metody WASOBI a poměrové metody při různých úrovních šumu. Modrou barvou je zobrazen průběh akčního napětí získaného poměrovou metodou; červenou barvou je znázorněn průběh získaný metodou WASOBI; zelenou barvou je zobrazen správný průběh akčního napětí. Průběhy jsou vzájemně posunuty na vertikální ose, aby bylo usnadněno jejich vizuální srovnání.

Metoda WASOBI korektně separuje AN a PA i v podmínkách výrazného šumu. Metoda WASOBI tak představuje široce použitelnou metodu pro odstranění pohybových artefaktů v optických záznamech AN.

16 DISKUZE

V rámci plnění cílů dizertační práce byl charakterizován PA, a tento byl odstraněn ze zaznamenaných optických signálů pomocí metody nezávislých komponent. Následující podkapitoly shrnují dosažené výsledky a srovnávají je s doposud publikovanými přístupy k odstranění PA z optických signálů.

16.1 Záznam optických signálů a elektrogramů

Navržený přístup k odstranění PA zohledňuje konstrukci záznamového systému. Záznamový systém [9] umožňuje zaznamenat AN s vysokým rozlišením (vzorkovací frekvence $f_{vz} = 2000\text{Hz}$, kvantovací úroveň 16bitů/10V). Ve srovnání s většinou systémů pro záznam AN optickou cestou, použitých např. v [137], [138], [139], [72], dosahuje systém vyššího časového rozlišení a umožňuje zcela bezkontaktní záznam AN. Navržený přístup potlačení PA zachovává výhodu bezkontaktního záznamu AN, která je klíčová pro zachování fyziologických podmínek srdce. Zaznamenané optické signály, jejichž charakteristika je uvedena v kapitole 10.4, jsou v plné shodě se specifiky záznamu AN optickou cestou, představenými studiemi [69], [6], [140].

Záznamy AN a PA byly získány s použitím modifikovaného měřicího protokolu. Měřicí protokol byl upraven tak, aby ve fázi stabilizace srdce (předcházející fázi nabarvení srdeční tkáně VSD) bylo izolované srdce osvětleno excitačním světlem v modrém spektru. Intenzita odraženého světla byla zaznamenána jako PA. Tímto způsobem je zajištěna kompatibilita s původním měřicím protokolem, zajišťujícím fyziologické podmínky experimentu a zároveň bylo možno získat záznam odraženého světla potřebný pro identifikaci tvaru PA.

Navržený přístup k odstranění PA z optických záznamů byl testován na záznamech, které neobsahovaly žádné jiné artefakty, které by mohly analýzu zkreslit. Záznamové zařízení umožňuje simultánně snímat elektrogramy (kapitola 10.2) a následně hodnotit přítomnost fyziologických artefaktů. Vizuální kontrola elektrogramů umožnila předem odhalit fyziologické změny ve sledované tkáni a vyhnout se tak situacím, kdy by sledovaný záznam AN obsahoval kromě PA také artefakty způsobené fyziologickými jevy. Ověření korektnosti nově navrženého přístupu bylo provedeno na záznamech, které neobsahovaly žádné patofyziologické artefakty v simultánně zaznamenaných elektrogramech.

16.2 Charakteristika pohybového artefaktu

Detailní popis vzniku PA dosud nebyl nikde publikován. Většina prací pouze konstatuje přítomnost PA, nijak však nekonkretizují podmínky, jenž k jeho vytvoření přispívají, ani se nevyjadřují ke kvantifikaci jeho velikosti v AN v rámci změněných fyziologických podmínek. V tomto směru je popis vzniku PA a jeho tvaru inovativní. Vznik PA souvisí s pohybem izolovaného srdce volně zavěšeného na kanyle v nádobce s fyziologickým roztokem, jenž ho obklopuje. V kapitole 4.1 jsou detailně popsány jevy, přispívající k vytvoření PA. Ukázky reálně zaznamenaných tvarů PA získaných z individuálních zvířat v různých časových intervalech jsou dokumentovány

v kapitole 11.

Dále je v práci popsán vývoj AN a PA během opakovaných ischemických inzultů. Bylo dokázáno, že tvar AP se inter-individuálně a intra-individuálně mění. Rovněž bylo (kapitola 11.2) dokázáno, že opakovanými globálními ischemiemi míra pohybu srdce klesá. Zároveň při opakovaných ischemických insultech klesá velikost okamžité výchylky AN, což popisuje kapitola 11.2. Tento poznatek je shodný s výsledky studie [72].

16.3 Odstranění pohybového artefaktu pomocí ICA

Na základě popisu vzniku PA byl navržen přístup, který s využitím simultánního záznamu optických signálů potlačuje vliv pohybu v záznamu AN. Přístup využívá metodu nezávislých komponent. Využití ICA pro separaci AN a PA z optických signálů je detailně popsáno v kapitole 7. Teoretické zdůvodnění použití metody ICA je popsáno v kapitole 12.1, která dokumentuje souvislost matematického modelu ICA s konstrukčním řešením záznamové aparatury. ICA dokáže separovat AN a PA bez apriorní znalosti jejich charakteristik, a navíc nevyžaduje informaci o procesu smísení průběhů AN a PA. Metoda ICA díky tomu představuje silný nástroj pro odstranění PA. Zatímco prostředky digitální filtrace pro odstranění PA selhávají kvůli neznalosti procesu smísení, ICA stále dokáže korektně PA z optických signálů odstranit. Díky specifickým konstrukčním řešením záznamové aparatury je navržená metoda odstranění PA unikátní a žádný podobný přístup nebyl dosud publikován. Navržený přístup byl publikován na mezinárodní kardiologické konferenci CINC [141] a pilotní studie byly publikovány na studentské soutěži EEICT [142].

16.4 Ověření korektnosti separace

Potlačení PA metodou nezávislých komponent bylo ověřeno na modelových i reálných datech.

Teoretické vyhodnocení použitelnosti metody ICA bylo ověřeno na modelových datech, a je detailně popsáno v kapitole 0. Modelové signály využívaly teoretický průběh AN generovaný modelem pro AN srdečních buněk levé komory srdce malých laboratorních zvířat [102]. Model, popsáný v kapitole 12.2.1, přesně odpovídá skutečným experimentálním podmínkám. Schopnost korektní separace pomocí ICA byla ověřena pro několik tisíc repetitivních AN devalvovaných AP. Na základě analýzy metodou Monte Carlo bylo dokázáno (kapitola 15.1), že ICA dokáže korektně separovat AN a PA z modelových optických signálů.

Vyhodnocení schopnosti potlačení pohybu pro reálně zaznamenaná data je popsáno v kapitole 15.2. Odstranění PA pomocí ICA bylo testováno na záznamech pořízených na Lékařské fakultě Masarykovy Univerzity během experimentů popsáných v kapitole 10. Soubor dat obsahuje několik set repetitivních AN znehodnocených AP. Ověření korektnosti separace bylo provedeno srovnáním výsledků ICA s výsledky poměrové metody. Poměrová metoda, jež je nejčastěji používanou technikou zpracování signálu pro odstranění vlivu pohybu, je v současnosti pravděpodobně nejlepší metodou k potlačení PA. Vlastnosti poměrové metody přibližuje kapitola 6, a její princip

ve vztahu k použitému konstrukčnímu řešení popisuje kapitola 6.1. Reprezentativní výsledky ICA ukazuje kapitola 14.2, ostatní nezobrazené výsledky byly obdobné. Z výsledků je patrné, že ICA eliminuje vliv pohybu v zaznamenaných AN velmi dobře.

16.5 Srovnání ICA a alternativních přístupů k odstranění pohybového artefaktu

Pro odstranění PA jsou používány farmakologické blokátory [58] (kapitola 5.1) a techniky mechanického omezení pohybu srdce (kapitola 5.2). Tyto techniky mohou být doplněny, případně nahrazeny, technikami zpracování signálu. Mezi ně patří ICA a poměrová metoda. Metoda ICA je srovnatelnou alternativou k použití poměrové metody, neboť dosahuje stejných nebo lepších výsledků (kapitoly 15.2 a 15.3).

Výhody navrženého přístupu jsou:

- Schopnost úplného potlačení PA
- Nezávislost efektivity potlačení PA na jeho velikosti
- Zpracování původních dat bez potřeby předzpracování

První výhoda navrženého přístupu spočívá ve schopnosti úplně potlačit PA v záznamech AN (v případě ideálního konstrukčního řešení záznamového systému, viz např. kapitola 14.2). Potlačení PA v záznamech AN je dostatečné, takže není potřeba kombinovat ICA s farmakologickými nebo mechanickými blokátory pohybu. Tyto přístupy, včetně výhod a nevýhod, jsou popsány v kapitolách 5.1 a 5.2, a někdy bývají používány jako doplněk k použití technik zpracování signálu. Navržený přístup dokáže potlačit PA vzhledem ke všem jevům (kapitola 4.1), které jej utváří, včetně vlivu změněné orientace srdce vzhledem k fotodetektoru, popsaném v kapitole 4.1.2. Touto schopností převyšuje přístup využívající ICA přístupy využívající registraci pohybu v dvojdimenzionální scéně, které projev změněné orientace srdce potlačit nedokáží [70].

Druhá výhoda navrženého přístupu spočívá v nezávislosti efektivity potlačení PA na jeho velikosti v záznamech AN. Tím se navržený přístup liší od velké části dosavadních přístupů, u kterých při výrazném pohybu srdce docházelo ke snižování účinnosti potlačení PA [73], [51]. Navržený přístup je proto vhodný i pro signály s proměnlivou velikostí PA.

Třetí výhoda navrženého přístupu spočívá ve zpracování originálních dat. Navržený přístup umožňuje potlačit PA bez potřeby předzpracování zaznamenaného optického signálu, např. pro zvýšení poměru signálu k šumu [70]. Jakákoliv forma předzpracování založená na průměrování repetice AN svým principem devalvuje přesnost tvaru AN, a neumožňuje zachytit nepravidelně se objevující změny jeho tvaru v individuálních repeticích. Ojedinelý výskyt patofyziologických dějů je zvlášť limitujícím faktorem v případě farmakologických studií, kde je nutno důsledně kontrolovat individuální repetice AN.

Nově navržený přístup je svými vlastnostmi vhodný pro odstranění PA ve studiích základní elektrofyziologie srdce, ve studiích změn experimentálních podmínek na elektrofyziologii srdce [143] a ve studiích žádoucích i nežádoucích vlivů nově syntetizovaných farmak. Dále může být využit v experimentech, u nichž je cílem zaznamenávat současně AN a migraci vápníku [10].

16.6 Limitace odstranění pohybového artefaktu pomocí ICA

ICA má dvě omezení. Tato omezení plynou ze samotné podstaty metody a jsou vlastní všem variantám ICA, včetně WASOBI. ICA nedokáže u separovaných komponent určit dvě charakteristiky: energii odhadnutých komponent a pořadí separovaných komponent.

16.6.1 Neznámý rozptyl signálů

Energii separovaných komponent nelze určit proto, že se během iterace ICA mění jak separační matice, tak odhadované komponenty. Vynásobením odhadované komponenty jakýmkoliv číslem, např. λ , může být vzápětí eliminováno vydělením odpovídajícího řádku separační matice stejným číslem, jak je ukázáno následujícím vztahem:

$$\mathbf{x} = \sum_i \left(\frac{1}{\lambda_i} a_i \right) (s_i \lambda_i) \quad 16.1$$

kde \mathbf{x} je vektor signálů, λ_i je libovolná konstanta, a_i je prvek mixážní matice a s_i je komponenta.

Navíc jsou obvykle z důvodu numerické optimalizace ICA algoritmu po každé iteraci komponenty normalizovány tak, aby jejich rozptyl byl roven jedné, $E\{s_i^2\} = 1$. Také z tohoto důvodu není možné získat informaci o energii separované komponenty.

Při praktickém použití ICA nepředstavuje neznalost energie separovaných komponent žádný problém. Optickou metodou může být zaznamenávána pouze relativní změna membránového napětí [28] a proto ztráta energie komponenty během procesu její separace metodou ICA nepředstavuje ztrátu informace. Opticky zaznamenaná výchylka AN je úměrná intenzitě emisního světla, která je úměrná membránovému napětí snímané buňky. Kromě toho však závisí intenzita snímaného emisního světla na množství navázaného VSD v oblasti měřené tkáně, absolutním počtu snímaných buněk, parametrech optického systému a na míře internalizace barviva v cytosolu. Díky tomu je optický záznam vždy záznamem relativní změny intenzity světla.

Chybějící informaci o energii separovaného průběhu AN lze doplnit teoretickou úvahou. Zbytkové napětí má přibližnou hodnotu $U_m = -85\text{mV}$ a maximum AN dosahuje hodnoty přibližně $U_m = 10\text{mV}$ [28], [36]. Stačí proto přiřadit separovanému průběhu AN tyto hodnoty. Tento přístup je běžně používaným postupem při optickém záznamu AN.

Dále může dojít během procesu separace k tomu, že se kromě měřítka změní i znaménko separované komponenty. Ve shodě s předchozími úvahami může totiž konstanta λ_i nabývat různých hodnot, tedy i záporných. Ve výsledku pak může být některá (nebo obě) z odhadnutých komponent AN a PA otočená kolem horizontální osy. Také toto omezení prakticky nepředstavuje problém, protože tvar AN je natolik charakteristický, že lze vizuálně posoudit, zda je otočený správně, a v případě, že není, jej vynásobit konstantou -1 . U komponenty PA otočený průběh nevadí, protože smyslem použití ICA je jeho odstranění, u kterého je zcela lhostejné, zda bude PA odstraněn v původní, nebo otočené podobě.

16.6.2 Neznámé pořadí separovaných komponent

Druhý parametr, který nedokáže ICA určit, je pořadí komponent. ICA neumí určit pořadí separovaných komponent, protože vektorovou rovnici $\mathbf{X} (\mathbf{x} = \mathbf{A}\mathbf{s})$ lze rozepsat na vztah:

$$\mathbf{x} = \sum_{i=1}^n \mathbf{a}_i s_i \quad 16.2$$

kde \mathbf{x} je vektor signálů, \mathbf{a}_i je prvek mixážní matice a s_i je komponenta, a následkem toho lze díky komutativnosti sčítání permutovat pořadí sčítanců v sumě (16.2) a označit kteroukoliv nezávislou komponentu jako první. Při praktickém využití ICA pro separaci PA a AN nepředstavuje toto teoretické omezení žádný praktický problém, protože na pořadí separovaných komponent nezáleží.

16.6.3 Limitace konstrukčního řešení záznamové aparatury

Schopnost věrné rekonstrukce AN je pro reálně zaznamenaná data omezena limitací konstrukčního řešení. Jak je vysvětleno v kapitole 10.3, spektrální pásma jednotlivých optických signálů se mírně překrývají, což ve svém důsledku znemožňuje úplné odstranění PA. Toto omezení je však dáno pouze použitím konkrétního fotodetekčního prvku, jehož spektrální vlastnosti nejsou pro tento účel použité optimální. V případě použití jiného konstrukčního řešení je schopna metoda ICA potlačit pohybový artefakt úplně. To je dokázáno v kapitole 15, která vyhodnocuje úspěšnost metody pro modelová data.

17 ZÁVĚR

Dizertační práce je zaměřena na problematiku odstranění PA ze záznamů AN získaných optickou metodou. V širších souvislostech se zabývá optickým snímáním elektrické aktivity izolovaného srdce ve fyziologických podmínkách a pokročilými metodami zpracování signálů.

Práce popisuje v kapitolách 2 a 10 způsoby záznamu elektrické aktivity izolovaného srdce, a zvláště se věnuje popisu AN v kapitole 2.1, jehož záznam slouží k diagnostice vlivu experimentálních podmínek na elektrofyzilogii srdce. AN je zaznamenáváno optickou metodou, popsanou v kapitole 3. Optická metoda využívá VSD di-4-ANEPPS, popsané v kapitole 3, k převodu elektrické aktivity na změnu optických vlastností snímaného světla. Při záznamu AN optickou cestou však dochází k zarušení záznamu PA, jehož odstranění je jádrem předkládané dizertační práce.

Popisu vzniku PA a jeho charakteristice je věnována kapitola 4 a 11, ze kterých plyne, že PA se časově i frekvenčně překrývá s repeticemi AN a proto není možné je od sebe oddělit prostředky běžného zpracování signálu. Kvůli požadavkům daným experimentálním protokolem není možné potlačit pohyb srdce farmakologickými blokátory pohybu, popsanými v kapitole 5.1, ani postupy mechanického omezení pohybu, představené v kapitole 5.2, jenž bývají použity pro zmírnění, nebo úplné potlačení pohybu srdeční stěny vzhledem k fotodetektoru. Jediným vhodným způsobem potlačení PA je využití poměrové metody, představené v kapitole 6. Tato metoda však má své omezení, popsané v kapitolách 6.3 a 15.2, a proto je v této práci navržen pro odstranění PA zcela nový přístup, založený na ICA.

ICA, popsaná v kapitolách 7, 7.4 a 12, dokáže ze simultánně zaznamenaných optických signálů oddělit vzájemně statisticky nezávislé složky, reprezentující AN a PA. Z variant ICA je vybrána nejvhodnější varianta pro separaci AN a PA. Výběr byl proveden na základě teoretických vlastností variant ICA, popsaných v kapitolách 7.4 a 13 a empiricky, jak je popsáno v kapitole 14. Nejlepší variantou pro separaci AN a PA je WASOBI, popsaná v kapitolách 8.2.3 a 13.2.3.

Teoretická schopnost separace AN a PA pomocí ICA byla prokázána v kapitole 12 splněním podmínek separace a shodou modelu vzniku optických signálů s modelem ICA. Prakticky bylo ověření korektnosti separace AN a PA provedeno dvojím způsobem: Monte Carlo analýzou v kapitole 15.1, a srovnáním výsledků ICA a poměrové metody v kapitole 15.2. Bylo dokázáno, že ICA dokáže zcela potlačit PA v záznamech AN, dokonce i v prostředí vysokého šumu, jak je uvedeno v kapitole 15.3.

V kapitole 16 jsou diskutovány výhody a limitace nově navrženého přístupu k potlačení AP, a jeho možnosti jsou srovnány s alternativními známými postupy potlačení PA. Přístup k odstranění PA založený použití ICA může nalézt uplatnění v kardiologických experimentech zabývajících se základní elektrofyzilogii izolovaného srdce, vlivem farmak, vlivem ischemie, a v experimentech, u nichž je cílem zaznamenávat současně AN a migraci vápníku.

18 LITERATURA

- [1] D. C. SIGG, P. IAIZZO, X. YONG-FU a B. HE, Cardiac Electrophysiology Methods and Models, New York: Springer, 2010.
- [2] C. MATTEUCI, „Sur un phenomene physiologique produit par les muscles en contraction,” Ann Chim Phys, sv. 6, pp. 339-341, 1842.
- [3] D. LLOYD-JONES a kol., „Executive summary: heart disease and stroke statistics-2010 update: a report from the American Heart Association,” Circulation, sv. 7, pp. 46-215, 2010.
- [4] D. S. ROSENBAUM a J. JALIFE, Optical Mapping of Cardiac Excitation and Arrhythmias, Boston: Blackwell Publishing, 2001.
- [5] I. EFIMOV, D. HUANG, J. RENDT a G. SALAMA, „Optical mapping of repolarization and refractoriness from intact hearts,” Circulation, sv. 90, pp. 1469-1480, 1994.
- [6] C. HYATT, S. MIRONOV, F. VETTER, C. ZEMLIN a A. PETRSOV, „Optical Action Potential Upstroke Morphology Reveals Near-Surface Transmural Propagation Direction,” Circ Res, sv. 97, pp. 277-284, 2005.
- [7] M. INAGAKI, I. HIDAKA, T. AIBA, T. TATEWAKI, K. SUNAGAWA a M. SUGIMACHI, „High resolution optical mapping of cardiac action potentials in freely beating rabbit hearts,” v Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS, San Francisco, 2004.
- [8] S. DILLON, T. KERNER a J. HOFFMAN, „A system for in-vivo cardiac optical mapping,” IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine, sv. 1, pp. 95-108, 1998.
- [9] J. KOLÁŘOVÁ, K. FIALOVÁ, O. JANOUŠEK, M. NOVÁKOVÁ a I. PROVAZNÍK, „Experimental Methods for Simultaneous Measurement of Action Potentials and Electrograms in Isolated Heart,” Physiol. Res., sv. 59 (Suppl. 1), 2010.
- [10] K. LAURITA a A. SIGNAL, „Mapping action potentials and calcium transients simultaneously from the intact heart,” Am J Physiol Heart Circ Physiol, sv. 280, pp. 2053-2060, 2001.
- [11] A. NYGRAN, C. KONDO, R. CLARK a R. GILES, „Voltage-sensitive dye mapping in Langendorff-perfused rat hearts,” Am J Physiol Heart Circ Physiol., sv. 3, pp. 892-902, 2003.
- [12] I. PROVAZNÍK, M. NOVÁKOVÁ, Z. VESELÝ, M. BLAHA a M. CHMELÁŘ, „Electro-Optical Recording System for Myocardial Ischemia Studies in Animal Experiments,” v Computers in Cardiology, Danvers, USA, 2003.

- [13] M. NOVÁKOVÁ, K. NOGOVÁ, J. BARDOŇOVÁ a I. PROVAZNÍK, „Comparison of Two Procedures of Loading with Voltage-Sensitive Dye Di-4-ANEPPS in Rabbit Isolated Heart,“ v *Computers in Cardiology*, Bologna, Itálie, 2008.
- [14] K. FIALOVÁ, J. KOLÁŘOVÁ, O. JANOUŠEK, M. RONZHINA, I. PROVAZNÍK a M. NOVÁKOVÁ, „Effects of Voltage-Sensitive Dye di-4-ANEPPS on Isolated Rat Heart Electrogram,“ v *College of Biomedical Engineering & Instrument Science of Zhejiang University*, 2011.
- [15] K. FIALOVÁ, J. KOLÁŘOVÁ, I. PROVAZNÍK a M. NOVÁKOVÁ, „Comparison of Voltage-Sensitive Dye di-4-ANEPPS Effects in Isolated Hearts of Rat, Guinea Pig, and Rabbit,“ v *Computing in Cardiology*, Belfast, UK, 2010.
- [16] K. FIALOVÁ, J. KOLÁŘOVÁ, J. SEKORA, M. TANNENBERG, M. NOVÁKOVÁ a I. PROVAZNÍK, „Electrophysiological Effects of Voltage Sensitive Dye di-4-ANNEPS in Rabbit and Guinea Pig Isolated Heart,“ v *Biosignal 2010*, 2010.
- [17] G. SALAMA a B. CHOI, „Images of Action Potential Propagation in Heart,“ *News Physiol Sci*, sv. 15, pp. 33-41, 2000.
- [18] M. ARORA, A. MITHILESH, P. ZIPES a J. WU, „Optical Mapping Of Cardiac Arrhythmias,“ *Indian Pacing and Electrophysiology Journal*, sv. 4, pp. 187-196.
- [19] E. HILLMAN, O. BERNUS, E. PEASE a M. P. A. BOUCHARD, „Depth-resolved optical imaging of transmural electrical propagation in perfused heart,“ *Opt Express*, sv. 15, pp. 17827-41, 2007.
- [20] W. KONG, N. FAKHARI, O. SHARIFOV, R. IDEKER, W. SMITH a V. FAST, „Optical Measurement of Intramural Action Potentials in Isolated Porcine Heart Using Optrodes,“ *Heart Rhythm*, sv. 4, pp. 1430-1436, 2007.
- [21] M. SALAMA a M. MORAD, „Merocyanine 540 as an optical probe of transmembrane electrical activity in the heart,“ *Science*, sv. 191, p. 485– 487, 1976.
- [22] V. FAST a A. KLÉBER, „Microscopic conduction in cultured strands of neonatal rat heart cells measured with voltage-sensitive dyes,“ *Circ Res*, sv. 73, pp. 914-925, 1993.
- [23] J. DAVIDENKO, A. S. R. PETRSOV, W. BAXTER a J. JALIFE, „Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle,“ *Nature*, sv. 355, pp. 349-351, 1992.
- [24] F. SAMIE, O. BERENFELD, J. ANUMONWO, S. MIRONOV, S. UDASSI, J. BEAUMONT, S. TAFFET, A. PETRSOV a J. JALIFE, „Rectification of the background potassium current: a determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation,“ *Circ Res*, sv. 89, pp. 1216-1223, 2001.
- [25] B. CALDWELL, I. LEGRICE, D. HOOKS, D. TAI, A. PULLAN a D. SMAILL, „Intramural measurement of transmembrane potential in the isolated pig heart:

- validation of a novel technique," J Cardiovasc Electrophysiol, sv. 16, pp. 1001-1010, 2006.
- [26] I. EFIMOV, W. V.D.R. a Y. CHENG, „High resolution mapping of electrical activity of human atrial preparations using voltage-sensitive dyes and fluorescent imaging techniques," Journal of Investigative Medicine, sv. 44, pp. 376-381, 1996.
 - [27] K. UMAPATHY, S. MASSE, K. NAIR, T. FARID, E. SEVAPTSIDIS, J. ASTA, H. ROSS, R. CUSIMANO, K. S. a N. KUMURASWAMY, „The Relationship of Rotors to Scar Border Zones and Dominant Frequency Domains in Human Ventricular Fibrillation," Circulation, sv. 122, 2010.
 - [28] D. ROSENBAUM a J. JALIFE, Optical Mapping of Cardiac Excitation and Arrhythmias, John Wiley & Sons, 2001.
 - [29] J. KALIFA, M. KLOS, S. ZLOCHIVER, S. MIRONOV, K. TANAKA, N. ULAHANNAN, M. YAMAZAKI, J. JALIFE a O. BERENFELD, „Endoscopic fluorescence mapping of the left atrium: a novel experimental approach for high resolution endocardial mapping in the intact heart," Heart Rhythm, sv. 4, pp. 916-924, 2007.
 - [30] R. GRAY, „What Exactly Are Optically Recorded "Action Potentials"?", Journal of Cardiovascular Electrophysiology, sv. 10, pp. 1463-1466, 2007.
 - [31] E. FLUHLER, V. BURNHAM a L. LOEW, „Spectra, Membrane Binding, and Potentiometric Responses of New Charge Shift Probes," Biochemistry, pp. 5749-5755, 1985.
 - [32] I. EFIMOV, V. NIKOLSKI a G. SALAMA, „Optical Imaging of the Heart," Circ Res., sv. 94, pp. 21-33, 2004.
 - [33] P. IAZZO, Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices, New York: Springer, 2009.
 - [34] S. SILBERNAGL a F. LANG, Atlas patofyziologie člověka, Praha: Grada Publishing, 2001.
 - [35] J. RIJEN a V. M. HAROLD, „Cardiac Action Potentials, Ion Channels, and Gap Junctions," v Cardiac electrophysiology methods and models, New York, Springer, 2010, pp. 53-72.
 - [36] J. BAKKER a V. RIJEN, „Cardiac Action Potentials, Ion Channels, and Gap Junctions," v Cardiac Electrophysiology Methods and Models, New York , Springer, 2010, pp. 53-76.
 - [37] J. KOLÁŘOVÁ, „Metody měření a analýzy elektrické aktivity srdce v základním kardiologickém výzkumu. Habilitační práce.,“ 2009.
 - [38] L. NAVRÁTIL a J. ROSINA, Medicínská biofyzika., Praha: Grada, 2005, pp. 169-174.

- [39] F. KUSUMOTO, ECG Interpretation: From Pathophysiology to Clinical Application, New York: Springer, 2009.
- [40] I. TASAKI, A. WATANABE, R. SANDLIN a L. CARNAY, „Changes in fluorescence, turbidity and birefringence associated with nerve excitation,“ Proc Natl Acad Sci., sv. 61, pp. 883-888, 1968.
- [41] L. LOEW, S. SCULLY, L. SIMPSON a A. WAGGONER, „Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential,“ Nature, sv. 281, pp. 497-499, 1979.
- [42] M. SHENASA a M. BORGGREFE, Cardiac Mapping, New York: Blackwell publishing, 2003 .
- [43] P. DRAGSTEN a W. WEBB, „Mechanism of the membrane potential sensitivity of the fluorescent membrane probe merocyanine 540,“ Biochemistry, sv. 17, pp. 5228-5240, 1978.
- [44] P. FROMHERZ a A. LAMBACHER, „Spectra of voltage-sensitive fluorescence of styryl-dye in neuron membrane,“ Biochim Biophys Acta, sv. 1068, pp. 149-156 , 1991.
- [45] L. LOEW, L. COHEN, B. SALZBERG, A. OBAID a P. BEZANILLA, „Charge-shift probes of membrane potential: Characterization of aminostyrylpyridinium dyes on the squid giant axon,“ Biophys J, sv. 47, pp. 71-77, 1985.
- [46] A. WAGGONER a A. GRINVALD, „Mechanisms of rapid optical changes of potential sensitive dyes,“ Ann NY Acad Sci, sv. 303, pp. 217-241, 1977.
- [47] I. JOHNSON a M. SPENCE, „Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling,“ Molecular Probes, 2010.
- [48] V. FEDOROV, I. LOZITSKY, E. SOSUNOV, E. SOSUNOV, E. ANYUKHOVSKY, M. ROSEN, W. BALKE a I. EFIMOV, „Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiological study of rat and rabbit hearts, Heart Rhythm, 2007 May;4(5):619-26.,“ eart Rhythm, sv. 4, pp. 619-626, 2007.
- [49] J. KEPLER, „Ad Vitellionem paralipomena quibus astronomie pars optica traditur, Frankfurt 1604,“ Frankfurt, 1604.
- [50] S. KNISLEY, R. JUSTICE, W. KONG a P. JOHNSON, „Ratiometry of transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts,“ Am J Physiol Heart Circ Physiol., sv. 279, pp. 1421-1433, 2000.
- [51] D. TAI, B. CALDWELL, I. LeGRICE, D. HOOKS, A. PULLAN a B. SMAILL, „Correction of motion artifact in transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts,“ Am J Physiol Heart Circ Physiol, sv. 287, pp. 985-993, 2004.
- [52] R. BRANDES, V. FIGUEREDO, S. CAMACHO, B. MASSIE a M. WEINER, „Suppression of motion artifacts in fluorescence spectroscopy of perfused hearts,“ Am J Physiol., sv. 2, pp. 972-980, 1992.

- [53] L. DANSHI a S. NATTEL, „Pharmacological elimination of motion artifacts during optical imaging of cardiac tissues: Is blebbistatin the answer?.,“ *Heart Rhythm.*, sv. 5, pp. 1547-1571, 2007.
- [54] E. OSTAP, „2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor.,“ *J Muscle Res Cell Motil*, sv. 3, pp. 305-308, 2002.
- [55] J. GWATHMEY, R. HAJJAR a R. SOLARO, „Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium.,“ *Circ Res.*, sv. 5, pp. 1280-1292, 1991.
- [56] S. CALAGHAN, E. WHITE, S. BEDUT a J. LeGUENNEC, „Cytochalasin D reduces Ca^{2+} sensitivity and maximum tension via interactions with myofilaments in skinned rat cardiac myocytes.,“ *J Physiol.*, sv. 2, pp. 405-411, 2000.
- [57] J. LIU, C. CABO, R. SALOMONSZ, M. DELMAR, J. DAVIDENKO a J. JALIFE, „Effects of diacetyl monoxime on the electrical properties of sheep and guinea pig ventricular muscle.,“ *Cardiovasc Res.*, sv. 11, pp. 1991-1997, 1993.
- [58] T. SAKAI, „Cytochalasin D as the Depressant of Contraction of the Optical Monitoring of Action Potentials in Isolated Rat Atrium.,“ *J. Physiol. Sci.*, sv. 56, pp. 385-388, 2006.
- [59] M. LEE, S. LIN, T. OHARA, C. OMICHI, Y. OKUYAMA, E. CHUDIN, A. GARFINKEL, J. WEISS, H. KARAGUEUZIAN a P. CHEN, „Effects of diacetyl monoxime and cytochalasin D on ventricular fibrillation in swine right ventricles.,“ *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, sv. 6, pp. 2689-2696, 2001.
- [60] J. WU, M. BIERMANN, M. RUBART a D. ZIPES, „Cytochalasin D as excitation-contraction uncoupler for optically mapping action potentials in wedges of ventricular myocardium.,“ *J Cardiovasc Electrophysiol.*, sv. 12, pp. 1336-1347, 1998.
- [61] J. ALLINGHAM, R. SMITH a I. RAYMENT, „The structural basis of blebbistatin inhibition blebbistatin inhibition and specificity for myosin II.,“ *Nat Struct Mol Biol.*, sv. 12, pp. 378-379, 2005.
- [62] G. SALAMA a S. HWANG, „Simultaneous Optical Mapping of Intracellular Free Calcium and Action Potentials from Langendorff Perfused Hearts.,“ v *Current Protocols in Cytometry*, John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- [63] F. FENTON, E. CHERRY a B. KORNEICH, „Termination of equine atrial fibrillation by quinidine: an optical mapping study.,“ *J Vet Cardiol.*, sv. 2, pp. 87-103, 2008.
- [64] I. PROVAZNÍK, M. NOVÁKOVÁ, M. BLAHA, M. CHMELARŤ a Z. VESELÝ, „Fibre Optic Sensor for Recording of Action Potentials.,“ v *Intelligent Sensors, Sensor Networks and Information Processing.*, Melbourne, Austrálie, 2004.
- [65] N. D. H. BROWN, D. GAUTHIER a P. WOLF, „A Fiber-Based Ratiometric Optical Cardiac Mapping Channel Using a Diffraction Grating and Split

- Detector," *Biophys J.*, sv. 1, pp. 254-263, 2007.
- [66] L. BAKER, B. LONDON, B. CHOI, G. KOREN a G. SALAMA, „Enhanced dispersion of repolarization and refractoriness in transgenic mouse hearts promotes reentrant ventricular tachycardia," *Circ Res.*, sv. 4, pp. 396-407, 2000.
 - [67] I. EFIMOV, D. HUANG, M. RENDT a G. SALAMA, „Optical mapping of repolarization and refractoriness from intact hearts," *Circulation*, sv. 90, pp. 1469-1480, 1994.
 - [68] A. NYGREN, R. CLARK, D. BELKE, C. KONDO a W. W. F. GILES, „Voltage-Sensitive Dye Mapping of Activation and Conduction in Adult Mouse Hearts," *Annals of biomedical engineering*, sv. 8, pp. 958-967, 2000.
 - [69] S. GIROUARD, K. LAURITA a D. ROSENBAUM, „Unique Properties of Cardiac Action Potentials Recorded with Voltage-Sensitive Dyes," *J Cardiovasc Electrophysiol*, č. 7, pp. 1024-1038, 1996.
 - [70] M. ŠVRČEK, „Nové přístupy pro optická měření elektrické aktivity myokardu," Brno, 2010.
 - [71] V. MONTANA, D. FARKAS a L. LOEW, „Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential," *Biochemistry*, sv. 11, pp. 4536-4539, 1989.
 - [72] D. HIMEL a S. KNISLEY, „Imaging of Cardiac Movement Using Ratiometric and Nonratiometric Optical Mapping: Effect of Ischemia and 2, 3-Butanedione Monoxime," *IEEE transaction of medical imaging*, sv. 25, pp. 122-126, 2006.
 - [73] W. KONG, G. WALCOTT, W. SMITH, P. JOHNSON a S. KNISLEY, „Emission ratiometry for simultaneous calcium and action potential measurements with coloaded dyes in rabbit hearts: reduction of motion and drift," *J Cardiovasc Electrophysiol*, sv. 14, pp. 76-82, 2003.
 - [74] A. CHEN, F. VANHOLSBECK, D. TAI, M. ŠVRČEK a B. SMAILL, „Time-resolved all fiber fluorescence spectroscopy system," v *Proceedings of the SPIE*, San Francisco, 2010.
 - [75] A. HYVARINEN, J. KARHUNEN a E. OJA, *Independent Component Analysis*, New York: John Wiley & Sons, 2001.
 - [76] A. CICHOCKI a A. SHUN-ICHI, *Adaptive Blind Signal and Image Processing*, Chichester: John Wiley a Sons., 2002.
 - [77] L. TONG, R. LIU, V. SOON a Y. HUANG, „Indeterminacy and identifiability of blind identification," *IEEE Trans. on Circuits and Systems*, pp. 499-509, 1991.
 - [78] A. BELOUCHRANI, K. ABED-MERAIM, J. CARDOSO a E. MOULINES, „A Blind Source Separation Technique Using Second-Order Statistics," *IEEE Trans. on signal processing*, sv. 2, pp. 343-444, 1997.
 - [79] A. BELOUCHRANI a A. CICHOCKI, „Robust whitening procedure in blind

- source separation context,“ *Electronics Letters*, sv. 24, pp. 2050-2053, 2000.
- [80] S. CHOI a A. CICHOCKI, „Blind separation of nonstationary sources in noisy mixtures,“ *Electronics Letters*, pp. 848-849, 2000.
 - [81] A. YEREDOR, „Blind Separation of Gaussian Sources via Second-Order Statistics with Asymptotically Optimal Weighting,“ *IEEE signal processing letters*, sv. 7, č. 7, pp. 197-200, 2000.
 - [82] P. TICHAVSKY, E. DORON, A. YEREDOR a J. NIELSEN, „A Computationally Affordable Implementation an Asymptotically Optimal BSS algorithm for AR Sources,“ v *EUSIPCO*, Florence, Italy, 2006.
 - [83] L. TONG, V. SOON, Y. HUANG a R. LIU, „AMUSE: a new blind identification algorithm,“ v *Proc. IEEE ISCAS*, New Orleans, LA, 1990.
 - [84] L. MOLGEDEY a H. SCHUSTER, „Separation of a mixture of independent signals using time delayed correlations,“ *Physical Review Letters*, sv. 72, č. 23, pp. 3634-3637, 1994.
 - [85] L. TONG, Y. INOUE a R. LIU, „Waveform-preserving blind estimation of multiple independent sources,“ *IEEE Trans. on Signal Processing*, sv. 7, pp. 2461-2470, 1993.
 - [86] R. SZUPILUK a A. CICHOCKI, „Blind signal separation using second order statistics,“ v *Proc. of SPETO*, 2001.
 - [87] P. COMON a G. GOLUB, „Tracking a few extreme singular values and vectors in signal processing,“ *Proceedings of the IEEE*, pp. 1327-1343, 1990.
 - [88] P. COMON, „Separation of stochastic processes,“ v *Proc. Workshop on Higher-Order Spectral Analysis*, Vail, Colorado, 1989.
 - [89] A. BELOUCHRANI, K. C. J. ABED-MERAIM a E. MOULINES, „Second-order blind separation of temporally correlated sources,“ v *Proc. Int. Conf. on Digital Sig. Proc.*, Kypr, 1993.
 - [90] A. ZIEHE a K. MULLER, „TDSEP - an efficient algorithm for blind separation using time structure,“ v *ICANN'98*, Skovde, 1998.
 - [91] J. CARDOSO a A. SOLOUMIAC, „An efficient technique for the blind separation of complex sources,“ v *IEEE Signal processing workshop on Higher-Order Statistics*, South Lake Tahoe, 1993.
 - [92] J. CARDOSO a A. SOLOUMIAC, „Jacobi angles for simultaneous diagonalization,“ *SIAM Journal Mat. Anal. Appl.*, sv. 1, pp. 161-164, 1996.
 - [93] M. WAX a J. SHEINVALD, „A least-squares approach to joint diagonalization,“ *IEEE Signal processing letters*, sv. 2, pp. 52-53, 1997.
 - [94] H. SORENSON, *Parameter Estimation*, New York: Marcel-Dekker, 1980.
 - [95] O. LANGENDORFF, „Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen,“

Pflügers Archiv, pp. 291-332, 1898.

- [96] M. M. J. NOVÁKOVÁ a P. BRAVENÝ, „A modified perfusion system for pharmacological studies in isolated hearts. In Analysis of Biomedical Signals and Images,“ v 15th Biennial International Eurasip Conference Biosignal, Brno, 2000.
- [97] I. PROVAZNÍK, M. NOVÁKOVÁ, Z. VESELÝ, M. BLAHA a M. CHMELÁŘ, „Electro-Optical Recording System for Myocardial Ischemia Studies in Animal Experiments,“ v Computers in Cardiology, 2003.
- [98] J. KOLÁŘOVÁ, K. FIALOVÁ, O. JANOUŠEK, M. NOVÁKOVÁ a I. PROVAZNÍK, „Experimental methods for simultaneous measurement of action potentials and electrograms in isolated heart,“ Physiological Research, sv. S71, 2010.
- [99] J. BARDOŇOVÁ, I. PROVAZNÍK, M. NOVÁKOVÁ, K. NOGOVÁ a J. SEKORA, „New Recording Setup for Ratiometric Recording of Action Potentials by Optical Means,“ v Computers in Cardiology, 2008.
- [100] M. HARDY, C. POLLARD, B. B.-T. M. SMALL, A. WOODS a J. A.-G. N. VALENTIN, „Validation of a voltage-sensitive dye (di-4-ANEPPS)-based method for assessing drug-induced delayed repolarisation in beagle dog left ventricular midmyocardial myocytes,“ Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, sv. 60, 2009.
- [101] B. HILL a R. KENNETH, „Voltage-sensitive dyes Discerning Contraction and Electrical Signals in Myocardium,“ Biophysical Journal, pp. 255-257, 1982.
- [102] C. LUO a Y. RUDY, „A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction,“ Circ. Res., sv. 68, pp. 1501-1526, 1991.
- [103] A. GARNY, N. D.P., J. COOPER, R. SANTOS, A. MILLER, S. McKEEVER, P. NIELSEN a P. HUNTER, „CellML and associated tools and techniques,“ Phil. Trans. R. Soc. A., pp. 3017-3043, 2008.
- [104] A. REEVE, A. GARNY, A. MILLER a R. BRITTEN, „Biological Modelling Using CellML and MATLAB,“ The Open Pacing, Electrophysiology & Therapy Journal, sv. 3, pp. 60-65, 2010.
- [105] A. BOWMAN a A. AZZALINI, Applied Smoothing Techniques for Data Analysis, Oxford: Oxford University Press, 1997.
- [106] R. MODDEMEIJER, „On Estimation of Entropy and Mutual Information of Continuous Distributions,“ Signal Processing, sv. 3, pp. 233-246, 1989.
- [107] A. CICHOCKI, S. AMARI, K. SIWEK, T. TANAKA, A. PHAN a R. ZDUNEK, ICALAB – MATLAB Toolbox Ver. 3 for signal processing, 2007.
- [108] J. CARDOSO a A. SOLOUMIAC, „Blind beamforming for non-Gaussian signals,“ IEEE Proc. F (Radar and Signal Processing), sv. 6, pp. 362-370, 1993.

- [109] A. VEEN, „Joint diagonalization via subspace fitting techniques,“ v Proc. of IEEE ICASSP, Salk Lake, USA, 2001.
- [110] A. YEREDOR, „Blind source separation via the second characteristic function,“ Signal Processing, sv. 5, pp. 897-902, 2000.
- [111] A. YPMA, A. LESHEM a R. DUIN, „Blind separation of rotating machine sources: bilinear forms and convolutive mixture,“ Neurocomputing, 2002.
- [112] A. CICHOCKI a A. BELOUCHRANI, „Sources separation of temporally correlated sources from noisy data using a bank of band-pass filters,“ Proc. of Third International Conference on Independent Component Analysis and Signal Separation (ICA-2001), pp. 173-178, 2001.
- [113] A. CICHOCKI, T. RUTHOWSKI a K. SIWEK, „Blind extraction of signals with specified frequency bands,“ v Neural Networks for Signal Processing (NNSP-2002), Martigny, Switzerland, 2002.
- [114] R. GHARIEB a A. CICHOCKI, „Second order statistics based blind signal separation using a bank of subband filters,“ Journal of Digital Signal Processing, 2003.
- [115] S. CHOI a A. CICHOCKI, „Blind separation of nonstationary sources in noisy mixtures,“ Electronics Letters, pp. 848-849, 2000.
- [116] S. CHOI a A. CICHOCKI, „Blind separation of nonstationary and temporally correlated sources from noisy mixtures,“ v IEEE Workshop on Neural Networks for Signal Processing, Sydney, Australia, 2000.
- [117] S. CHOI a A. B. A. CICHOCKI, „Blind separation of second-order nonstationary and temporally colored sources,“ v Proceedings of the 11th IEEE Signal Processing Workshop on Statistical Signal Processing, Singapore, 2001.
- [118] S. CHOI, A. CICHOCKI a A. BELOUCHRANI, „Second order nonstationary source separation,“ v Journal of VLSI Signal Processing, 2002.
- [119] D. PHAM a J. CARDOSO, „Blind separation of instantaneous mixtures of non stationary sources,“ IEEE Trans. Signal Processing, sv. 9, pp. 1837-1848.
- [120] P. GEORGIEV a A. CICHOCKI, „Blind source separation via symmetric eigenvalue decomposition,“ v Proceedings of Sixth International Symposium on Signal Processing and its Applications, Kuala Lumpur, Malaysia, 2001.
- [121] P. GEORGIEV a A. CICHOCKI, „Robust blind source separation utilizing second and fourth order statistics,“ v International Conference on Artificial Neural Networks, Madrid, Spain, 2002.
- [122] A. HYVARINEN a E. OJA, „A Fast Fixed-Point Algorithm for Independent Component Analysis,“ Neural Computation, sv. 7, pp. 1483-1492, 1997.
- [123] A. HYVARINEN a E. OJA, „Independent Component Analysis: Algorithms and Applications,“ Neural Networks, sv. 4, pp. 411-430, 2000.

- [124] A. HYVARINEN, „Fast and Robust Fixed-Point Algorithms for Independent Component Analysis,“ IEEE Transactions on Neural Networks, sv. 3, pp. 626-634, 1999.
- [125] S. DING, „Independent Component Analysis without Predetermined Learning Parameters,“ v CIT, 2006.
- [126] S. DING, „A Power Iteration Algorithm for ICA Based on Diagonalizations of Non-Linearized Covariance Matrix,“ v ICICIC, 2006.
- [127] S. FIORI, „Fully-multiplicative orthogonal-group ica neural algorithm,“ Electronics Letters, sv. 24, pp. 1737-1738, 2003.
- [128] Z. KOLDOVSKÝ, P. TICHAVSKÝ a E. OJA, „Efficient Variant of Algorithm FastICA for Independent Component Analysis Attaining the Cramér-Rao Lower Bound,“ IEEE Trans. on Neural Networks, sv. 5, pp. 1265-1277, 2006.
- [129] P. TICHAVSKÝ, Z. KOLDOVSKÝ a E. OJA, „Performance Analysis of the FastICA Algorithm and Cramér-Rao Bounds for Linear Independent Component Analysis,“ IEEE Trans. on Signal Processing, sv. 4, 2006.
- [130] P. TICHAVSKÝ, Z. KOLDOVSKÝ, E. DONOR, A. YEREDOR a G. GOMEZ-HERRERO, „Blind Signal Separation by Combining Two ICA Algorithms: HOS-Based EFICA and Time Structure-Based WASOBI,“ v Proceedings of The 2006 European Signal Processing Conference, 2006.
- [131] A. CICHOCKI, T. RUTKOWSKI a T. TANAKA, „Beyond ICA: Multiresolution Subband Decomposition ICA (MSB-ICA), Smooth Component Analysis (SCA) with constraints, Non-Independent Blind Source Separation (NIBSS),“ v BSI , Riken, 2002.
- [132] V. CALHOUN, T. ADALI, G. PEARLSON a J. PEKAR, „Spatial and Temporal Independent Component Analysis of Functional MRI Data Containing a Pair of Task-Related Waveforms,“ Human Brain Mapping, pp. 43-53, 2001.
- [133] R. VAZQUES, H. VELEZ-PEREZ, R. RANTA, V. DORR, D. MAQUIN a L. MAILLARD, „Blind source separation, wavelet denoising and discriminant analysis for EEG artefacts and noise cancelling,“ Biomedical Signal Processing and Control, sv. 7, č. 4, pp. 389-400, 2012.
- [134] A. CICHOCKI a S. AMARI, Adaptive Blind Signal and Image Processing Learning Algorithms and Applications, New York, USA: John Wiley & Sons, 2002.
- [135] C. MELLISANT, A. YPMA, E. FRIETMAN a C. STAM, „A method for detection of Alzheimer's disease using ICA-enhanced EEG measurements,“ Artificial Intelligence in Medicine, sv. 3, p. 209-222, 2005.
- [136] J. ESCUDERO, R. HORNERO a S. ABASOLO, „Consistency of the blind source separation computed with five common algorithms for magnetoencephalogram background activity,“ Medical Engineering & Physics, sv. 10, pp. 1137-1144, 2010.

- [137] A. BACHTEL, R. GRAY, J. STOHLMAN a E. BOURGEOIS, „A Novel Approach to Dual Excitation Ratiometric Optical Mapping of Cardiac Action Potentials With Di-4-ANEPPS Using Pulsed LED Excitation,“ IEEE transaction on biomedical engineering, sv. 58, pp. 2120-2126, 2011.
- [138] M. ŠVRČEK, A. CHEN, S. RUTHERFORD, J. SEKORA, I. PROVAZNÍK a B. SMALL, „Suppressing Motion Artifact In Cardiac Elecctrical Optical Mapping,“ v Biosignal 2010, Brno, 2010.
- [139] C. HYATT, S. MIRONOV, M. WELLNER, O. BERENFELD, A. POPP, D. WEITZ, J. JALIFE a A. PETRSOV, „Syntesis of Voltage-Sensitive Fluorescence Signals from Three-Dimensional Myocardial Activation Patterns,“ Biophysical Journal, sv. 85, pp. 2673-2683, 2003.
- [140] A. KLÉBER, „The Shape of the Electrical Action-Potential Upstroke: A New Aspect From Optical Measurements on the Surface of the Heart,“ Circ. Res., sv. 97, pp. 204-206, 2005.
- [141] O. JANOUŠEK, J. KOLÁŘOVÁ, M. RONZHINA, M. NOVÁKOVÁ a S. KRISHNAN, „Suppression of Motion Artifacts in Optical Action Potential Records by Independent Component Analysis,“ 2012.
- [142] O. JANOUŠEK, „Independent component analysis for motion artefact suppression,“ v Sborník prací konference a soutěže Student EEICT 2010, Brno, 2010.
- [143] M. FRANZ, J. FLAHERTY, E. PLATIA, B. BULKLEY a M. WEISFELDT, „Localization of regional myocardial ischemia by recording of monophasis action potentials,“ Circulation, sv. 69, pp. 593-604, 1984.
- [144] P. BRAVENÝ, osobní sdělení, 2011.
- [145] T. SAKAI, „Cytochalasin D as the depressant of contraction for the optical monitoring of action potentials in isolated rat atrium,“ J Physiol Sci., sv. 5, pp. 385-388, 2006.
- [146] R. GRAY a I. BANVILLE, „Transmembrane Recordings from an Isolated Rabbit Heart using CCD Cameras from RedShirt Imaging LLC,“ 2009.

19 SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

AN	akční napětí
PA	pohybový artefakt
ICA	metoda nezávislých komponent
ms	milisekunda
Um	membránové napětí
BDM	2,3-butandion monoxim
C	Celsius
fvz	vzorkovací frekvence
λ	vlnová délka
nm	nanometr
mV	milivolt
μ V	mikrovolt
VI	vzájemná informace
SIR	poměr signálu k přeslechu
SIRA	poměr signálu k přeslechu pro mixážní matici
SIRS	poměr signálu k přeslechu pro původní a separovanou komponentu

20 SEZNAM PŘÍLOH

A Přílohy	118
A.1 Prohlášení o etickém způsobu zacházení se zvířaty	118

A PŘÍLOHY

A.1 Prohlášení o etickém způsobu zacházení se zvířaty

Experimenty na zvířecích srdcích byly prováděny v Laboratoři experimentální kardiologie na Lékařské fakultě Masarykovy Univerzity v souladu se směrnici pro práci se zvířaty stanovenými českou a evropskou legislativou.

CURRICULUM VITAE

Osobní údaje

Oto Janoušek
Habřinova 779/6
62400 Brno, Česká Republika
janouseko@feec.vutbr.cz / otojanousek@centrum.cz

Vzdělání

- 2008 – současnost Doktorské studium, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínské techniky. Studijní program Biomedicínská elektronika a biokybernetika.
- 2006 – 2008 Magisterské studium, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínské techniky. Studijní program Biomedicínské a ekologické inženýrství.
- 2003 - 2006 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav radioelektroniky. Studijní program Elektronika a sdělovací technika.

Profesní zkušenosti

- 2013 Kurz Základy receptorové neurofyzologie, AV ČR.
- 2012 Kurz Funkce a struktura buněčných membrán, AV ČR.
- 2012 Osvědčení o odborné způsobilosti k řízení, provádění a kontrole pokusů na zvířatech
- 2009 Zahraniční stáž, Ryerson University, Kanada.
- 2008 Kurz základů vědecké práce, AV ČR

Akademická ocenění

- 2008 Cena děkana Fakulty elektrotechniky a komunikačních technologií Vysokého učení technického v Brně za diplomovou práci.
- 2006 Cena děkana Fakulty elektrotechniky a komunikačních technologií Vysokého učení technického v Brně za bakalářskou práci.

Projekty

- 2011 JANOUŠEK, O., KOLÁŘOVÁ, J., ČMIEL V. Realizace terapeutických úloh využívajících biologickou zpětnou vazbu, FRVŠ 3258/G3, zahájení: 01.01.2011, ukončení: 31.12.2011

Vybrané publikace

- in press JANOUŠEK, O.; KOLÁŘOVÁ, J.; RONZHINA, M.; NOVÁKOVÁ, M.; PROVAZNÍK, I.; Motion artefact in voltage-sensitive fluorescent dye emission during repeated ischemia of isolated heart. *Physiological Research*. *In press*.
- 2012 JANOUŠEK, O.; KOLÁŘOVÁ, J.; RONZHINA, M.; NOVÁKOVÁ, M.; KRISHNAN, S. Suppression of Motion Artifacts in Optical Action Potential Records by Independent Component Analysis. In *Computing in Cardiology*. *Computing in Cardiology 2012*. 39. 2012. s. 641-644. ISBN: 978-1-4673-2076- 4. ISSN: 2325- 887X
- 2010 JANOUŠEK, O.; KOLÁŘOVÁ, J.; NOVÁKOVÁ, M.; PROVAZNÍK, I. Three-Dimensional Electrogram in Spherical Coordinates: Application to Ischemia Analysis. *Physiological Research*, 2010, roč. 59, č. Suppl 1, s. S51. ISSN: 0862- 8408.